

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Aufklärung der Funktion virus-kodierter miRNAs während
einer Gammaherpesvirus-Infektion anhand des murinen
Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) als Modell**

Martin Ludwig Strehle

aus
Oettingen in Bayern

2012

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Heiko Adler betreut und von Herrn Prof. Dr. Klaus Förstemann von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.04.2012

Martin Strehle

Dissertation eingereicht am 26.04.2012

1. Gutachter Prof. Dr. Klaus Förstemann

2. Gutachter Prof. Dr. Heiko Adler

Mündliche Prüfung am 16.07.2012

Wirklichkeit ist ein Blitz, der in jedem Steine gefangen zuckt. Weckst du ihn nicht, so bleibt der Stein ein Stein, die Stadt eine Stadt, die Schönheit schön, die Langeweile langweilig, und alles schläft den Traum der Dinge, bis du, aus deinen hochgespannten Strömen her, sie mit dem Gewitter "Wirklichkeit" überflutest.
-Hermann Hesse

Im Verlauf der Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

**„Identification and Analysis of Expression of Novel MicroRNAs of Murine
Gammaherpesvirus 68“**

Jia Yun Zhu[§], Martin Strehle[§], Anne Frohn, Elisabeth Kremmer, Kai P Höfig,
Gunter Meister, Heiko Adler

Journal of Virology, 2010 vol.84 (19) pp. 10266-75

§ = geteilte Autorenschaft / equal contribution

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Herpesviren	1
1.1	Allgemeines zu Herpesviren	1
1.1.1	Das Virion	2
1.1.2	Produktion und Aufbau des Virions	3
1.1.3	Struktur des viralen Genoms	4
1.1.4	Lebenszyklus und Replikation von Herpesviren	5
1.2	Gammaherpesviren	7
1.2.1	Epstein-Barr Virus (EBV)	7
1.2.2	Kaposi's-Sarcoma Assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	8
1.3	Murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)	8
1.3.1	MHV-68 als Modell	9
1.3.2	Infektion mit MHV-68 - <i>in vivo</i>	11
2	MicroRNAs (miRNAs) und kleine RNAs (sRNAs)	14
2.1	Einführung zu miRNAs und sRNAs	14
2.1.1	Biogenese und Prozessierung von miRNAs	14
2.1.2	Drosha und Dicer - RNasen im Detail	17
2.1.3	Argonaut und RISC-Etablierung	17
2.1.4	Effektorwirkung von miRNAs	18
2.2	Virale MicroRNAs (vmiRNAs)	20
2.2.1	Einführung zu vmiRNAs	20
2.2.2	MicroRNAs in Herpesviren	20
2.2.3	Prozessierung der viralen tRNAs und miRNAs von MHV-68	21
2.2.4	Identifizierung von weiteren viralen miRNAs	23
2.2.5	Identifizierung von mRNA Zielsequenzen für virale miRNAs	24
3	Zielsetzung der Arbeit	26
II	Material und Methoden	27
4	Material	27
4.1	Eukaryotische Zellen	27
4.2	Bakterien	27
4.3	Viren	27
4.4	Plasmide	28
4.5	Nährmedien	29
4.5.1	Nährmedien für Zellkultur	29
4.5.2	Nährmedien für Bakterien	29
4.6	Antibiotika	30
4.7	Antikörper	30

4.8	Enzyme	30
4.9	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	31
4.10	Chemikalien und Reagenzien	34
4.11	Puffer und Lösungen	34
4.12	Kommerzielle Reaktionssätze	37
4.13	Geräte	38
4.14	Computerprogramme und bioinformatische Hilfsmittel	38
5	Methoden	39
5.1	Bakteriologische Methoden	39
5.1.1	Kultivierung prokaryotischer Zellen	39
5.1.2	Kryokonservierung von Bakterien (Glyzerinkultur)	39
5.1.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien	39
5.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	39
5.1.5	Elektrotransformation von Bakterien	40
5.1.6	Chemische Transformation von Bakterien	40
5.2	Molekularbiologische Methoden	40
5.2.1	Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)	40
5.2.2	Isolation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)	40
5.2.3	Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion	40
5.2.4	Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	41
5.2.5	Isolation von RNA für <i>Northernblot</i> auf miRNAs	41
5.2.6	Isolation von RNA für RT-PCR und Mikroarray	42
5.2.7	Erzeugen von cDNA für RT-PCR	42
5.2.8	Mikroarray-Analysen	43
5.2.9	Expressionsanalysen mittels <i>Nanostring (n-counter)</i> Technologie	44
5.2.10	Erzeugen der Bibliothek der sRNAs für die 454-Sequenzierung	44
5.2.11	<i>Northernblot</i> auf virale miRNAs	45
5.2.12	<i>Realtime</i> -PCR auf virale miRNAs (<i>stem-loop</i> RT-PCR)	46
5.2.13	RT-PCR auf virale und zelluläre Gene	46
5.3	Zellkultur	47
5.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	47
5.3.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	47
5.3.3	Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren	47
5.3.4	Luciferase-Assay	48
5.4	Virologische Methoden	48
5.4.1	Infektion von Zellen mit MHV-68	48
5.4.2	Präparation eines Virusstocks	49
5.4.3	Titerbestimmung von MHV-68 durch Plaqueassay	49
5.4.4	Isolierung von Virionen-DNA	50
5.4.5	Wachstumskurven mit MHV-68 <i>in vitro</i>	50
5.4.6	Bestimmung der Plaquegröße	50
5.5	Proteinbiochemische Methoden	51
5.5.1	Argonaut Immunopräzipitation	51
5.6	Bioinformatische Methoden	52

5.6.1	Analyse der 454-Sequenzierung	52
5.6.2	Vorhersage der miRNA <i>targets</i> durch TargetScan	54
5.6.3	Analyse der funktionellen Homologe durch <i>miRvestigator Framework</i>	55
III Ergebnisse		56
6	Hochdurchsatz-Sequenzierung von MHV-68 infizierten Zelllinien	56
6.1	Fraktionierung der sRNAs und Sequenzierung	56
6.2	Identifizierung von neuen miRNAs in MHV-68	58
6.3	Sequenzhomologien der neuen miRNAs von MHV-68 zu anderen miRNAs	59
6.4	Lokalisation der neuen miRNAs im Genom von MHV-68	60
6.5	Validierung der Expression der neuen miRNAs von MHV-68	62
6.6	Zelluläres miRNA Profil in MHV-68 infizierten Zelllinien	63
6.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der 454-Sequenzierung von Bibliotheken aus MHV-68 infizierten Zelllinien	68
7	Charakterisierung der für die weiteren Untersuchungen eingesetzten Viren	69
7.1	Vergleichbare lytische Replikation von Wildtyp und Mutante $\Delta 1-9$ in verschiedenen Zelllinien	69
7.2	Kein Einfluss der miRNAs auf den Zell-zu-Zell Transfer in verschiedenen Zelllinien	71
7.3	Nachweis der Expression von miRNAs durch RT-PCR	72
7.3.1	Expression der viralen miRNAs in persistent infizierten B-Zellen S11 und infizierten B-Zellen Ag8	72
7.3.2	Expression der viralen miRNAs während der lytischen Replikation in Fibroblasten	76
7.3.3	Nachweis von miRNAs in verschiedenen Geweben aus <i>in vivo</i> Proben	78
7.4	Virale Genexpression bei MHV-68 Wildtyp und Mutanten	81
7.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der für diese Arbeit eingesetzten Viren	83
8	Analyse der Zielsequenzen der miRNAs von MHV-68	83
8.1	Bioinformatische Vorhersage	84
8.2	Mikroarray-Analyse der infizierten Zelllinien	86
8.3	Kombination der Ansätze zur <i>target</i> -Identifizierung von viralen miRNAs	87
8.3.1	Alveoläre Epithelzelllinie - MLE-12	88
8.3.2	B-Zelllinie - Ag8	89
8.4	Weitere experimentelle Ansätze zur <i>target</i> -Identifizierung viraler miRNAs	91
8.4.1	RIP-CHIP	91
8.4.2	<i>Nanostring</i>	94
8.5	Zusammenfassung der Gene in potentielle Zielgenkandidaten	96
8.6	Funktionale Validierung der Zielgene durch Luciferase-Assay	97
8.7	Zusammenfassung der Identifizierung von <i>targets</i> der miRNAs von MHV-68	98

9	Ausblick und weitere Experimente	98
IV	Diskussion	99
10	Hochdurchsatz-Sequenzierung und Identifizierung von neuen MHV-68 miRNAs	99
10.1	Identifizierung neuer miRNAs von MHV-68	99
10.2	Lokalisation, Transkription und Prozessierung der neuen miRNAs im Ge- nom von MHV-68	100
10.3	Expressionsmuster der viralen miRNAs	101
10.4	Homologien und konservierte Sequenzen von viralen miRNAs	104
10.5	Expression der zellulären miRNAs während der lytischen Replikation sowie während der Latenz und nach Induktion der Reaktivierung	106
11	Charakterisierung der eingesetzten Viren	108
11.1	Expression viraler miRNAs bei Infektionen durch MHV-68 Wildtyp und MHV-68 Δ 1-9 <i>in vitro</i>	108
12	Identifizierung von <i>target</i> -Sequenzen	111
12.1	Identifizierung viraler <i>target</i> -Sequenzen	111
12.2	Identifizierung zellulärer <i>target</i> -Sequenzen	112
12.2.1	Bioinformatik und Mikroarray	112
12.2.2	miRNA <i>target</i> -Identifizierung über experimentelle Ansätze mittels RIP-CHIP und <i>Nanostring</i> nach Argonaut-IP	113
13	Modellvorstellung zur Wirkungsweise der miRNAs von MHV-68	117
14	Zusammenfassung	120
V	Anhang	122
VI	Tabellenverzeichnis	128
VII	Abkürzungsverzeichnis	130
VIII	Literaturverzeichnis	133
IX	Danksagung	157

Teil I

Einleitung

1 Herpesviren

1.1 Allgemeines zu Herpesviren

Herpesviren (HV) bilden eine weit verbreitete Gruppe großer DNA Viren, mit Wirtsorganismen von Menschen und anderen Vertebraten bis hin zu Invertebraten. Die Einteilung in die Familie der *Herpesviridae* beruhte ursprünglich auf der Architektur der Virionen und den biologischen Eigenschaften [Roizman et al., 1981]. Durch die technische Entwicklung der Sequenziermethoden im Laufe der Jahre ist ein breitgefächelter Zugang zu den Nukleotidsequenzen verschiedener Herpesviren möglich geworden. Die Taxonomie der Herpesviren wurde deshalb durch die Studiengruppe des Internationalen Komitees für Virus Taxonomie (ICTV) entsprechend erweitert. Die Übergruppe *Herpesvirales* vereint nun die drei Familien der Herpesviren. Diese sind a) Herpesviren von Säugetieren, Vögeln und Reptilien (*Herpesviridae*), b) Herpesviren von Fischen und Amphibien (*Alloherpesviridae*) und c) Herpesviren der zweischaligen Weichtiere bzw. Muscheln (*Mala-coherpesviridae*) [Davison et al., 2009, McGeoch et al., 2006, Roizman and Pellet, 2007]. Im Laufe der Evolution entwickelte sich für die meisten Tierarten mindestens ein spezifisches Herpesvirus, so dass heute die Zahl an identifizierten Herpesviren mit mehr als 200 anzugeben ist [Roizman and Pellet, 2007]. Die Familie der *Herpesviridae* wird in drei Unterfamilien unterteilt (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae*). Die humanpathogenen Vertreter der *Herpesviridae* sind Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1), Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2), Humanes Zytomegalievirus (HCMV), Varizella-Zoster Virus (VZV), Epstein-Barr Virus (EBV) und Kaposi's Sarcoma-assoziiertes Herpesvirus (KSHV) sowie Humane Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, HHV-7). Sie lassen sich den einzelnen Unterfamilien (siehe Tabelle 1) zuordnen. Die Zugehörigkeit zur Familie *Herpesviridae* zeigt sich durch vier signifikante biologische Eigenschaften: 1.) Sie besitzen eine Vielzahl an Enzymen für den Nukleinsäurenmetabolismus (z.B. Thymidin Kinase, Ribonukleotid Reduktase), DNA Synthese (z.B. DNA Polymerase, Helikase) und Proteinprozessierung (z.B. Protein Kinase). 2.) Die Synthese der viralen DNA sowie die Fertigung des Capsids geschehen im Kern der Zelle, während die Reifung des Virions auf dem Weg durch das Zytoplasma erfolgt. 3.) Die Produktion von neuen, infektiösen Viruspartikeln geht mit der Zerstörung der infizierten Zelle einher (lytische Replikation). 4.) Herpesviren sind in

Virus	Subfamilie	Erkrankungen
Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)	α	Herpes Simplex, Gingivostomatitis herpetica, Eczema herpeticatum
Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2)	α	Herpes genitalis, Herpes neonatorum
Varizella Zoster Virus (VZV)	α	Varizellen, Zoster
Epstein-Barr Virus (EBV)	γ	Infektiöse Mononukleose, Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom, lymphoproliferative Erkrankungen bei Immunsuprimierten
Zytomegalievirus (CMV)	β	Neonatale Infektion, atypische Mononukleose, Transfusionsinfektionen, Chorioretinitis bei HIV/AIDS
Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)	β	Exanthema subitum
Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	β	Exanthema subitum, infektiöse mononukleoseähnliche Erkrankung
Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8; KSHV)	γ	Kaposi-Sarkom

Tabelle 1: Übersicht der humanpathogenen Herpesviren der Familie *Herpesviridae* nach Stockfleth [2005] mit den ihnen zugeordneten Krankheitsbildern

der Lage, lebenslang latent in ihrem natürlichen Wirt zu verbleiben [Roizman and Pellet, 2007].

1.1.1 Das Virion

Die typische Architektur der Herpesvirionen ist geprägt durch das icosahedrale Capsid (Triangulationszahl $T=16$) und dem doppelsträngigen DNA Genom (dsDNA) mit einer Größe von 120-230 Kilobasen (kb) je nach Unterart (siehe Abbildung 1) [McGeoch et al., 2006, Roizman and Pellet, 2007]. Die Komponenten eines Virions sind neben dem Capsid, das Tegument und die Hülle. Gemeinsam haben sie einen Gesamtdurchmesser von ca. 200 nm. Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass die äußere Hülle eine trilaminare Form besitzt [Epstein, 1962], und im Vergleich zu anderen behüllten Viren an der Oberfläche eine größere Anzahl von kürzeren Glycoproteinen aufweist [Wildy and Watson, 1962]. Das Tegument befindet sich zwischen Capsid und Hülle, und neben einer geringen Asymmetrie und variablen Dichte hat es keine spezielle, äußere Erscheinung [Roizman and Furlong, 1974, Roizman and Pellet, 2007]. In elektronen- und kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde eine Polarität innerhalb des Teguments festgestellt [Stefan et al., 1999, Trus et al., 1999]. Das Capsid hat einen Durchmesser von 100 - 130 nm und baut sich aus 162 Kapsomeren zu 150 Hexon- und 12 Pentonproteinen auf (siehe Abbildung 1 A) [Booy et al., 1996]. Noch nicht tegumentierte Capside liegen in der infizierten Zelle in drei Hauptformen vor, den A-, B- und C-Capsiden [Gibson, 1996]. A-Capside

besitzen keine Kernstruktur, B-Capside haben bereits Gerüstproteine, jedoch noch kein Genom und C-Capside tragen lediglich das virale Genom und keine Gerüstproteine mehr.

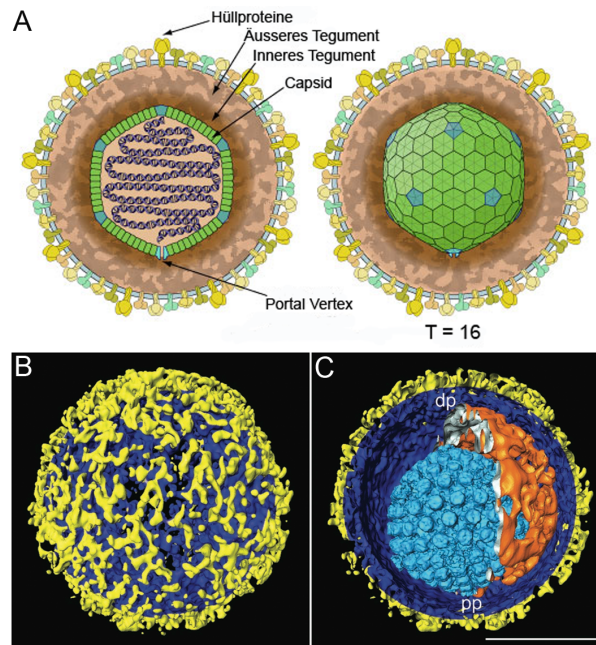


Abbildung 1: A) Schema eines Herpesvirus-Virions, modifiziert entnommen von <http://viralzone.expasy.org>. B) Ansicht der Virionenoberfläche durch eine Kryo-Elektronen Tomographie mit der Verteilung der Glykoproteine (gelb), die sich von der Membran (blau) abheben. C) Ein virtueller Schnitt in das Virion zeigt das Capsid (hellblau) und das Tegument (orange) innerhalb der Hülle mit der Membran (blau) und den Glykoproteinen (gelb). pp, Proximaler Pol; dp, Distaler Pol; Maßstab = 100 nm; entnommen aus Grünewald et al. [2003].

1.1.2 Produktion und Aufbau des Virions

Damit ein fertiges Virion aus einer Wirtszelle für Infektionen von weiteren Zellen verfügbar ist, muss es durch bestimmte Prozesse in verschiedenen Abschnitten der Zelle reifen. Wie in Kapitel 1.1 bereits angeführt, befindet sich die virale DNA im Zellkern und ihre Synthese findet ebenfalls dort statt. Darüber hinaus entsteht dort das Capsid über mehrere Zwischenstufen (siehe Kapitel 1.1.1) [Roizman and Pellet, 2007]. Durch Assoziation des Capsids mit der Kernlamina wird der Kernexport eingeleitet (*primary envelopment*, siehe Abbildung 2). Folgende drei Möglichkeiten für den nukleären Export werden kontrovers diskutiert [Mettenleiter and Minson, 2006]: 1.) Hüllenassoziation während des Transits durch die innere nukleäre Membran (INM) mit nachgestelltem zytoplasmatischen Transport im inneren von Röhren und Vesikeln aus Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) sowie des Golgi Apparats. 2.) Hüllenassoziation an der inneren nukleären Membran (INM) und Enthüllung beim Eintritt in das Zytoplasma. 3.) Transport

von nicht umhüllten Capsiden durch beschädigte oder vergrößerte nukleäre Poren [Johnson and Baines, 2011, Leuzinger et al., 2005, Mettenleiter, 2006, Mettenleiter et al., 2006]. Bei der zweiten Möglichkeit werden im Zytoplasma die tegumentumhüllten Capside einer sekundären Umhüllung durch Verschmelzung mit Membranen des Golgi Apparats, des *trans* Golgi Netzwerks (TGN) und Endosomen unterzogen (*secondary envelopment*; dargestellt siehe Abbildung 2). Diese Möglichkeit wird durch grundlegende genetische und biochemische Daten unterstützt [Johnson and Baines, 2011, Mettenleiter, 2002, Mettenleiter et al., 2009], andere Möglichkeiten sind jedoch nicht auszuschließen. Das Freisetzen des Virions in den extrazellulären Raum erfolgt über die Verschmelzung mit der Plasmamembran (Exozytose, siehe Abbildung 2) [Johnson and Baines, 2011]. In Epithelzellen können Virionen nach der sekundären Umhüllung im TGN an spezifischen Zelloberflächen entlassen werden. Dadurch kann die Verbreitung der viralen Partikel über Speichel, Milch oder Urin, aber auch über Zell-zu-Zell Schnittstellen (*junctions*) gesteuert werden [Curanovic and Enquist, 2009, Johnson and Huber, 2002].

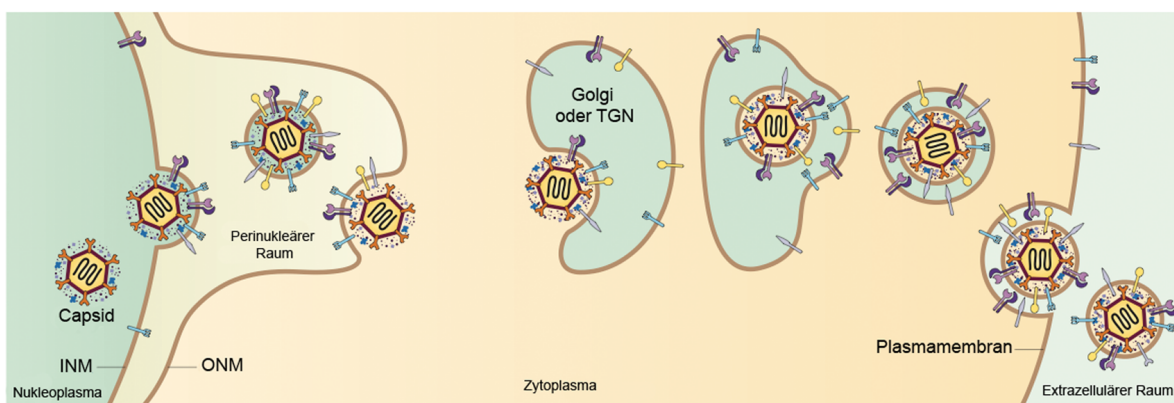


Abbildung 2: Überblick über den Export- und Reifeweg des Virions. Die Capsidbildung findet im Kern statt. Dort erfolgt die Verschmelzung mit der inneren nukleären Membran (INM) und der Übertritt in das Zytoplasma. Dort wird das Capsid an der äußeren nukleären Membran (ONM) enthüllt. Im Zytoplasma reift das Virion durch weitere Umhüllungs- und Enthüllungsprozesse des Capsids, bis die finale Verschmelzung mit der Plasmamembran zur Freisetzung des Virions in den extrazellulären Raum führt. TGN, *trans* Golgi Netzwerk; modifiziert entnommen aus Johnson and Baines [2011].

1.1.3 Struktur des viralen Genoms

Die aus Herpesvirionen isolierten Genome bestehen aus linearer, doppelsträngiger DNA (dsDNA) mit ungepaarten komplementären Nukleotiden an jedem Ende (Terminale *Repeats*). In der Familie der Herpesviren reichen die Genomgrößen von 124 kbp (Kilo Basenpaare) bei *Simian Varicella Virus* (SVV; *Alphaherpesvirinae*) bis 241 kbp bei *Chimpanzee Cytomegalovirus* (CCV; *Betaherpesvirinae*) [Davison et al., 2003, Gray et al., 2001]. In

der Regel werden die Protein-kodierenden Gene von der RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert [Alwine et al., 1974]. Die Expression der viralen Gene ist während der lytischen Replikation streng reguliert und kann in drei Abschnitte, IE (*immediate early*), E (*early*) und L (*late*), eingeteilt werden. Die frühen (*early*) Gene kodieren für Enzyme aus dem Nukleotidmetabolismus und der DNA Replikation sowie für eine kleine Anzahl von Hüll- und Glykoproteinen. Den größeren Anteil an Hüll- und Glykoproteinen tragen die späten (*late*) Gene [McGeoch et al., 2006]. Jedes virale Gen besitzt, bis auf vereinzelte Ausnahmen, bei denen durch die gleichen Polyadenylierungsstellen überhängende 3'-koterminale Transkripte entstehen, seinen eigenen Promotor [Wagner, 1985]. Der überwiegende Anteil der Genome von Herpesviren besteht aus Protein-kodierenden Regionen. Einige Bereiche jedoch exprimieren ncRNAs (*non coding* RNAs), die ihre Funktion nicht durch Translation erhalten. Die Familie der *Gammaherpesvirinae* besitzt sRNAs (*small* RNAs), wie z.B. die EBERs von EBV [Rosa et al., 1981], oder die tRNA-ähnlichen Transkripte von MHV-68 [Bowden et al., 1997], die durch RNA-Polymerase III transkribiert werden. Ferner wurden in Mitgliedern der Familien *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaherpesvirinae* miRNAs (*micro* RNAs) identifiziert [Cai et al., 2005, Grey et al., 2005, Pfeffer et al., 2004; 2005] .

1.1.4 Lebenszyklus und Replikation von Herpesviren

Herpesviren haben zwei distinkte Phasen in ihrem Lebenszyklus: Lytische Replikation und Latenz. Die lytische Replikation von Herpesviren findet im Zellkern der Wirtszelle statt (siehe Eigenschaften von Herpesviren, Kapitel 1.1). Dazu muss ein Herpesvirus Virion aus dem extrazellulären Raum in eine Zelle eindringen. Dies kann durch verschiedene Pfade geschehen. Zum einen kann das Virion über Endozytose internalisiert werden. In dem resultierenden Endosom kommt es daraufhin zur Azidifizierung des Milieus, was die Fusion der viralen Hülle mit der Endosomenmembran veranlasst. Ein anderer, und von den meisten HV bevorzugter Eintrittsmechanismus erfolgt über multiple Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen. Diese führen an der Zelloberfläche zur Fusion der Zellmembran mit der viralen Hülle. Virale Glykoproteine und virale Membranproteine binden bei α -, β - und γ -HV an Heparansulfat auf Proteoglykanen [Gillet et al., 2007, Mark et al., 2006, Shukla and Spear, 2001, Spiller et al., 2006, Steer et al., 2010]. Bei Untersuchungen mit HSV wurde der Eintritt als die Fusion des Virions mit der Plasmamembran beschrieben [Nicola et al., 2003]. Das humane Herpesvirus 6 (HHV-6) infiziert lymphoide T-Zellen durch Endozytose [Cirone et al., 1992], EBV die lymphoblastoide Zelllinie Raji durch Fusion, und normale B-Zellen durch Endozytose in dünnwandige, nicht-Clathrin-tragende Vesikel [Miller and Hutt-Fletcher, 1992], während KSHV clathrinabhängige Endozytose

zum Eintritt verwendet [Akula et al., 2003]. Für MHV-68 konnte in murinen Fibroblasten (NIH3T3) der Eintritt durch Endozytose nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3 Nr.1) [Peng et al., 2010]. Nach Eintritt in die Zelle werden die viralen Partikel in Endosomen entlang von Mikrotubuli durch den Dynein/Dynactin Motor Protein Komplex zu den Kernporen transportiert [Döhner et al., 2002], um dort mit dem portalen Vertex (siehe Abbildung 1 A, Seite 3) in Richtung Kern orientiert zu binden (siehe Abbildung 3 Nr. 2-3). Die Kernlokalisation erfolgt dann durch Importine [Sodeik et al., 1997]. Das lineare Genom wird intranukleär kovalent zirkularisiert [Garber et al., 1993], und bereits 30 Minuten nach Zelleintritt beginnt die streng koordinierte Expressionskaskade. Wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt, wird der Großteil der viralen Transkripte durch RNA-Polymerase II erzeugt, ist ungespleißt, und wird durch Proteine der Wirtszelle 5'-capped und 3'-polyadenyliert. Während der lytischen Replikation inaktivieren HV die Transkription der Wirtszelle, damit auf der einen Seite das Abwehrpotential der Wirtszelle reduziert wird, und auf der anderen Seite genügend Ressourcen für die virale Replikation vorhanden sind. Im Gegensatz zu anderen Pathogenen sind HV nicht von der S-Phase des Zellzyklus abhängig, beeinflussen jedoch kritische Regulationspunkte [Cheng et al., 1997, Ellis et al., 1999, Flemington, 2001]. Alle Unterfamilien der HV weisen eine enge Assoziation zu zellulären Proteinen auf und assoziieren mit subnukleären Strukturen wie ND10 (Nukleäre Domäne 10) oder PML-NB (*promyelocytic leukemia nuclear body*) für funktionelle Replisome [Tavalai and Stamminger, 2009]. Damit die Initiation der Replikation im Replisom erfolgt, ist gezieltes Aufwinden von bestimmten DNA Sequenzen, den sogenannten Ursprüngen der lytischen Replikation (*oriLyt*), notwendig. Das Fortschreiten der Replikation erfolgt von einem oder mehreren *oriLyt loci* bidirektional [Boehmer and Nimonkar, 2003]. Zur Aufrechterhaltung der Latenz ist im Lebenszyklus der HV die lytische Replikation streng reguliert. Ein komplexes Wechselspiel zwischen viralen und zellulären Proteinen zur Replikationsinitiation ist notwendig [He and Lehman, 2001]. Bei γ -HV werden die konservierten Rta (ORF50 bei MHV-68) und Zta Proteine für die Induktion des lytischen Zyklus benötigt [Fixman et al., 1995, Gao et al., 1998, Ragoczy et al., 1998]. Sie sind Master-Regulatoren der Transkription (Replikations und Transkriptions Aktivator, Rta) und müssen während der latenten Phase absolut reprimiert werden. Die Reaktivierung aus latent infizierten B-Zellen kann *in vitro* durch verschiedene chemische Stimulanzen wie Phorbol-12-myristat-13-acetat oder Natriumbutyrate (wie z.B. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA) durch Aktivierung von Rta ausgelöst werden [Speck et al., 1997]. In der Latenzphase ist bei allen HV nur eine sehr geringe bis gar keine Replikation detektierbar [Boehmer and Nimonkar, 2003]. Die Umhüllungs- und Enthüllungsprozesse während des Tegumenterwerbs und des Austritts aus dem Kern sowie die Freisetzung von neuen Virionen aus

der Wirtszelle sind bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben (siehe Abbildung 3 Nr. 5-7).

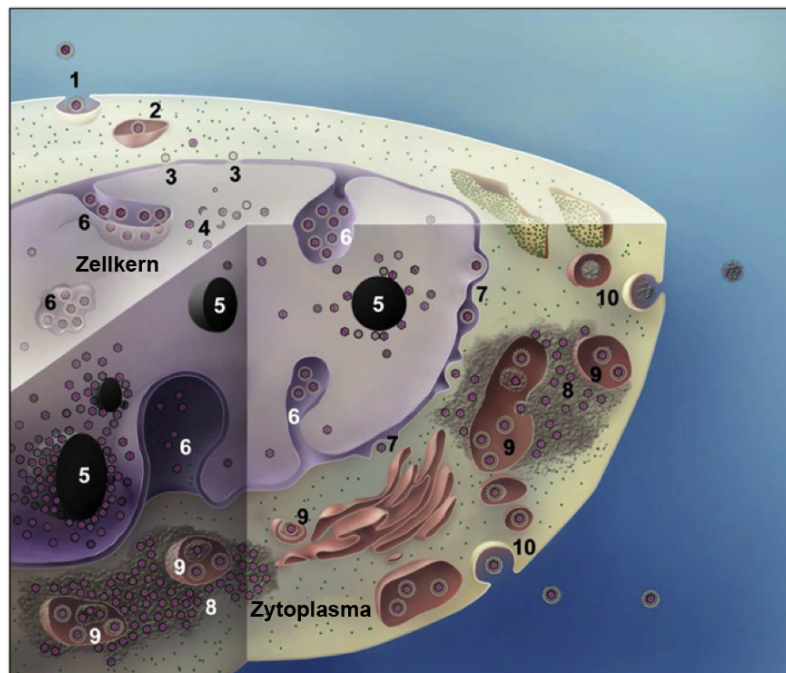


Abbildung 3: Schematische Darstellung des lytischen Lebenszyklus von MHV-68 in der Wirtszelle. Das Bild zeigt die graphisch aufgearbeiteten Daten einer 3D Elektronentomographischen (3D-ET) Studie von mit MHV-68 infizierten NIH3T3, einer murinen Fibroblastenzelllinie. Der Eintritt 1) erfolgt über Endozytose, gefolgt von dem Transport 2) ins Endosom und der Injektion 3) der viralen DNA in den Zellkern. Durch die virale Replikation bilden sich neue Kapside 4). Dies führt zur Ausbildung von intranukleären *inclusion bodies* 5), die über nukleäre Membraninvaginationen 6), aus dem Kern 7) austreten. Die Reifung durch Tegumentation 8) und sekundäres *envelopment* 9) findet im Zytoplasma statt. Der Austritt aus der Zelle erfolgt durch Exozytose 10). Entnommen aus Peng et al. [2010].

1.2 Gammaherpesviren

Die Gruppe der Gammaherpesviren lässt sich in die Lymphocryptoviren ($\gamma 1$ -Herpesviren) und Rhadinoviren ($\gamma 2$ -Herpesviren) einteilen [Lacoste et al., 2010]. Zwei bekannte humanpathogene Gammaherpesviren sind Epstein-Barr Virus (EBV, $\gamma 1$ -HV) und Kaposi's Sarkoma-Assoziiertes Herpesvirus (KSHV, $\gamma 2$ -HV) (siehe Tabelle 1, Seite 2).

1.2.1 Epstein-Barr Virus (EBV)

EBV war das erste beschriebene humane, tumorassoziierte Virus und wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tumorbiopsien gefunden [Epstein et al., 1964]. Die Durchseuchungsrate der Weltbevölkerung ist mit über 90% sehr hoch, und eine Infektion führt normalerweise zu keinen gesundheitlichen Langzeiteinschränkungen [Taylor and Blackbourn, 2011]. Während eine Infektion im Kindesalter asymptomatisch verläuft, zeigen sich bei Jugendlichen und Erwachsenen die Symptome einer infektiösen Mononukleose.

Bereits kurz nach Entdeckung des Virus konnte gezeigt werden, dass EBV B-Zellen *in vitro* zu kontinuierlich proliferierenden, lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) transformiert [Henle et al., 1967]. Dieser Immortalisationsprozess führt bei Patienten mit eingeschränktem Immunsystem zur Bildung von Lymphomen. 1997 wurde EBV von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) aufgrund der Beteiligung bei zahlreichen Krankheiten bzw. Lymphomen als karzinogener Erreger klassifiziert [Taylor and Blackbourn, 2011]. Die prominentesten davon sind Burkitt's Lymphom, Post-Transplantations Lymphom, NK/T-Lymphom (Extranodales *Natural Killer* T-Zell Lymphom) und NPC (Nasopharynx Karzinom).

1.2.2 Kaposi's-Sarcoma Assoziiertes Herpesvirus (KSHV)

KSHV wurde 1994 in AIDS-assoziierten Kaposi's Sarkomen (KS) entdeckt und später in Zusammenhang mit allen KS Fällen von HIV positiven wie negativen Patienten gebracht [Chang et al., 1994]. Die Übertragung von KSHV findet höchstwahrscheinlich oral über den Austausch von infiziertem Speichel statt [Blackbourn et al., 1998, Pauk et al., 2000]. Es ist eine sexuelle wie auch eine asexuelle Übertragung denkbar [Ambroziak et al., 1995, Angeloni et al., 1998, Blackbourn and Levy, 1997, Blackbourn et al., 1999]. Im Vergleich zu EBV kommt KSHV nicht ubiquitär vor, und nur ein geringer Anteil von ca. 5% der gesunden Weltbevölkerung ist infiziert [Gao et al., 1996, Kedes et al., 1996, Lennette et al., 1996]. Dies führte zur Annahme, dass die Transmission weniger effizient verläuft [Taylor and Blackbourn, 2011]. Neben dem KS ist KSHV noch als ursächlich für das Primäre Effusions-Lymphom (PEL) und die Multizentrische Castleman's Krankheit (MCD) anzusehen. Von der IARC wurde KSHV ebenfalls als karzinogener Erreger der Gruppe 1 eingestuft [Bouvard et al., 2009]. KS bildet sich als multifokale Krankheit in Patienten mit Immunschwächen, unter anderem nach Organtransplantationen oder bei HIV Infektionen [Taylor and Blackbourn, 2011]. Der größte Teil der infizierten Tumorzellen trägt KSHV in einem latenten Replikationszustand, mit nur einem geringen Anteil an nachweisbarer lytischer Replikation, welche wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung der Latenz/Infektion verantwortlich ist.

1.3 Murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)

MHV-68, auch γ -HV68, MuHV4 (murines Herpesvirus 4) oder mgHV (murines Gammaherpesvirus) genannt, ist ein natürliches Pathogen der Nager und wurde vor 30 Jahren aus Rötel- und Waldwühlmäusen in Osteuropa isoliert [Blaskovic et al., 1980]. Eine Infektion über den Respirationstrakt führt zu einer initialen, lytischen Infektion der Epithelzellen

in der Lunge, von wo aus sich das Virus auf die Latenzreservoir (B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) ausbreitet [Coleman et al., 2010, Flaño et al., 2000]. Die höchste latente Viruslast tritt gleichzeitig mit einer Splenomegalie auf, welche von ähnlichen Symptomen wie bei einer infektiösen Mononukleose und einer lymphoproliferativen Krankheit begleitet wird [Übersichtsartikel Nash et al., 2001].

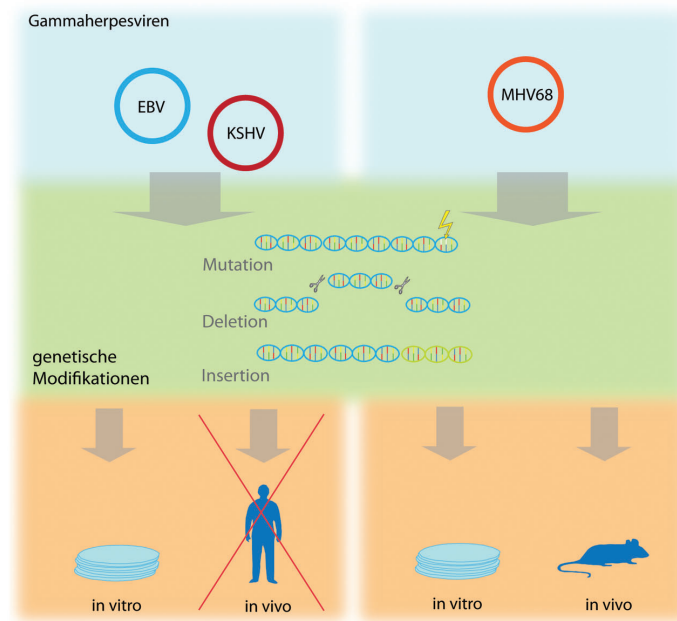
Die genetische Linie von MHV-68 hat sich nach Schätzungen vor ca. 60 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorfahr aus dem Affen separiert [McGeoch et al., 2005]. Die 119 451 Basenpaare (bp) des Genoms wurden vollständig sequenziert und die initiale Annotation identifizierte 80 Gene und acht tRNA-ähnliche Moleküle [Virgin et al., 1997]. Bei dieser Annotation wurden die offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF) durch den Transkriptionsstart bei Methionin und einer Länge größer als 100 Aminosäuren identifiziert. In Übereinstimmung mit der Konvention zu den bis dato bekannten ORFs der anderen HV wurden konservierte virale Gene chronologisch und funktional zugeordnet. Nicht-konservierte Gene wurden als individuell MHV-68 zugehörig mit M1 - M14 bezeichnet, und das zu KSHV homologe K3 wurde entsprechend seines humanen Pendant benannt. Inzwischen führten technische Neuerungen zu einer transkriptom-basierten Annotation, welche nicht-kodierende RNAs, gespleißte Exons und kleinere nicht-kodierende Gene identifizieren konnte [Johnson et al., 2010].

1.3.1 MHV-68 als Modell

Die starke evolutive Anpassung der Herpesviren an den jeweiligen Wirt begrenzt die Infektiosität für andere Wirte. Somit sind mit humanen HV keine Modellorganismen infizierbar. Als natürliches Nager-Pathogen kann MHV-68 auch Labormäuse infizieren (siehe Abbildung 4 A). Klinisch induziert es bei Mäusen ähnliche Symptome wie EBV (siehe Kapitel 1.3), genetisch ist es jedoch näher verwandt zu KSHV (siehe Abbildung 4 B) [Doherty et al., 1997, Virgin et al., 1997]. Darüber hinaus repliziert MHV-68 *in vitro* in vielen Zelltypen, wodurch es leichter als bei den humanen Homologen fällt, Viren in einer ausreichenden Menge zu generieren. Weiter stellt die Verwendung des Modellorganismus Maus eine intensiv beforschte Genetik von Seiten des Wirts bereit und ermöglicht daher Zugang zu etablierten Modellen für menschliche Krankheiten. Über genetische Veränderungen des viralen Genoms durch die BAC-Technologie (Mutation, Deletion oder Insertion), können detaillierte Untersuchungen von einzelnen ORFs von MHV-68 ermöglicht werden [Adler et al., 2000]. Bei der BAC-Technologie (*bacterial artificial chromosome*) wird das virale Genom als BAC in *E. coli* modifiziert und amplifiziert und weiter zur Erzeugung von infektiösen Virionen verwendet. Zusammengefasst ergibt MHV-68 somit ein nützliches Modell zur Untersuchung von Pathogenese, Immunologie und Onkogenität von Gamma-

herpesviren.

A



B

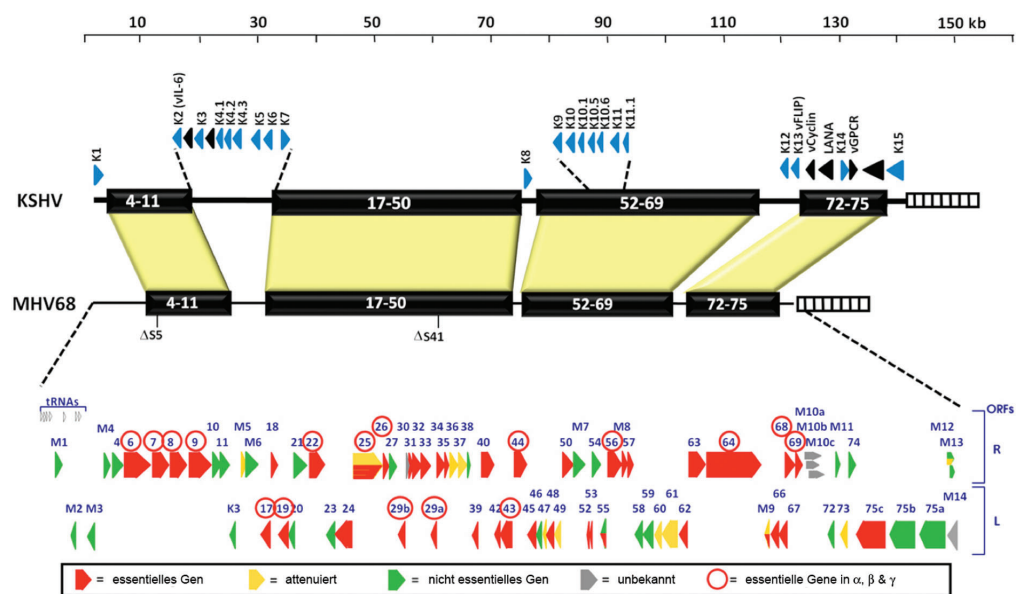


Abbildung 4: A) Schematische Darstellung der tropismusbedingten Vorteile von MHV-68 als Modell für Infektionen von Gammaherpesviren. B) Gegenüberstellung der beiden genetisch verwandten viralen Genome von KSHV und MHV-68, mit Visualisierung der homologen/konservierten Bereiche (gelb) und den jeweils virusspezifischen Genen (KSHV - K; MHV-68 - M). Die rot markierten Gene sind essentielle Gene bei MHV-68, während die mit einem zusätzlichen roten Kreis als essentielle Gene in α -, β - und γ -HV gelten. Entnommen aus Speck and Ganem [2010].

1.3.2 Infektion mit MHV-68 - *in vivo*

Im Gegensatz zu den für EBV und KSHV beschriebenen Infektionsrouten ist der natürliche Übertragungsweg von MHV-68 nicht bekannt. Daher werden viele Methoden zur Infektion benutzt (intraperitoneale, intrazerebrale oder intranasale Inokulation), jedoch ist keine als physiologisch relevant bewiesen [Stevenson and Efstathiou, 2005]. Der Weg der intranasalen Infektion weist im Vergleich zu den anderen jedoch die meisten Charakteristika einer natürlichen Transmission auf. Eine Infektion durch Gammaherpesviren lässt sich in drei klinische Phasen unterteilen: akute, lytische Replikation, Latenz und Reaktivierung. Nach der Primärinfektion und der lytischen Replikation im Lungenepithel [Sunil-Chandra et al., 1992] gelangen die Viren in den lokalen Lymphknoten (mediastinalen Lymphknoten, MLN) in Kontakt mit Dendritischen Zellen (DC), Makrophagen (MP) und B-Zellen, welche das Latenzreservoir bilden (siehe Abbildung 5). Die akute Phase der lytischen Replikation in der Lunge findet vor allem in alveolären Epithelzellen statt [Sunil-Chandra et al., 1992], und wird von den Symptomen einer Bronchiolitis begleitet. Sie ist 9 - 12 Tage nach der Infektion abgeklungen. Über die Infektion der systemisch wandernden Immunzellen, hauptsächlich B-Zellen, gelangt das Virus in die Milz. Aber auch B-Zell-defiziente Mäuse entwickeln Latenz [Usherwood et al., 1996b, Weck et al., 1999]. An Tag 10 nach der Infektion bildet sich durch Proliferation und Expansion von CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie B-Zellen eine Splenomegalie aus [Sunil-Chandra et al., 1992, Usherwood et al., 1996a], die ihren Höhepunkt an Tag 16-18 mit einer Frequenz an infizierten Zellen von 1 in 100 Milzzellen findet [Barton et al., 2010]. Das Virus verbleibt innerhalb des Latenzreservoirs lebenslang in seinem Wirt. Die Phase der Latenz selbst kann aber noch weiter unterteilt werden. In einem frühen Stadium findet die Expansion der Latenz statt. Dabei verändert sich das virale Genexpressionsmuster von der großen Anzahl lytischer Proteine auf eine kleine Auswahl an viralen Proteinen zur direkten Regulation der B-Zell Signalwege. Unabhängig von der Infektionsroute und -menge ist die latente Viruslast 5-6 Wochen nach dem Zeitpunkt der Infektion in der Milz auf 1 in 100 000 Zellen gesunken [Flaño et al., 2000]. Der lebenslange Latenzstatus ist erreicht. Dieser ist durch die Expression von lediglich sehr wenigen viralen Proteinen zur Aufrechterhaltung des viralen Episoms gekennzeichnet. In diesem Zustand findet sich Latenz auch in anderen zellulären Reservoirs wie DC, MP und sogar Epithelzellen (siehe Abbildung 5). Durch eine Reaktivierung aus einem der beiden Latenzzustände werden neue Virionen für eine Re-Infektion freigesetzt, was als notwendig für die Aufrechterhaltung der Latenz gilt [Barton et al., 2010].

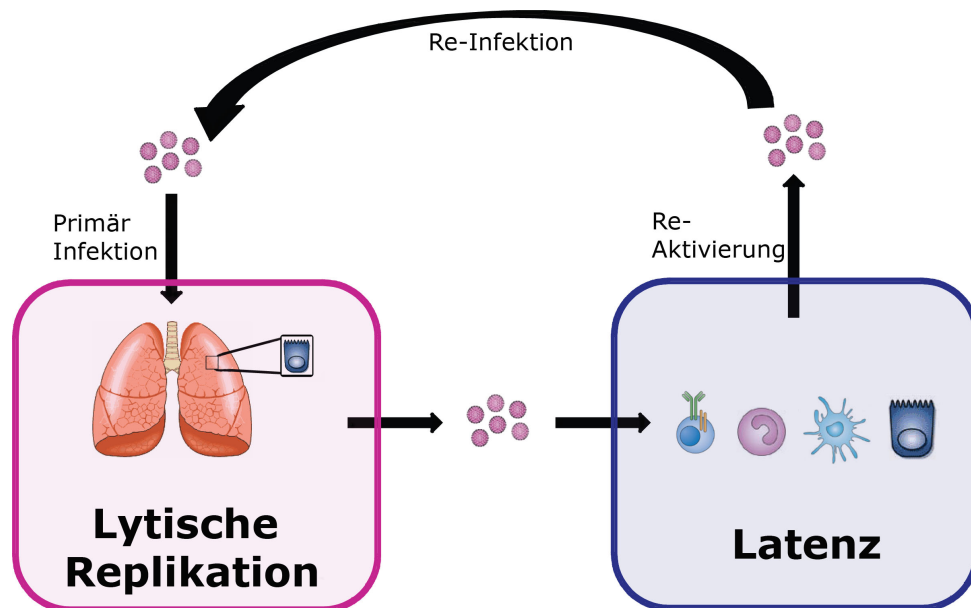


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von MHV-68 *in vivo*.

Intrinsische und angeborene Immunantwort Obwohl MHV-68 vor allem Immunzellen als Latenzreservoir nutzt, ist es auf dem Weg dorthin den Abwehrmechanismen der verschiedenen Immunbarrieren ausgesetzt. Diese werden in zell-intrinsische, angeborene und adaptive Immunreaktionen des Wirtsorganismus unterteilt. Unter der zell-intrinsischen Immunreaktion werden die unabhängigen Reaktionen einer einzelnen Zelle auf eine Infektion zusammengefasst. Darunter fallen *silencing* von viralen Genen durch Methylierung und Deacetylierung von Histonen [Takacs et al., 2010], Aktivierung der DNA-Reparatur Maschinerie (*DNA damage response, DDR*) [Bartek et al., 2007], Induktion von Apoptose und Autophagie [Bortoluci and Medzhitov, 2010, Lagunoff and Carroll, 2003] und Aktivierung des NF- κ B Signalweges [Krug et al., 2009]. Die Signalweiterleitung durch Toll-Like Rezeptoren (TLR) [Gargano et al., 2008, Guggemoos et al., 2008] und Aktivierung von Interferon- $\alpha\beta$ [Theofilopoulos et al., 2005] finden zwar in der Zelle statt, sind aber bereits der angeborenen Immunantwort des Wirtsorganismus zuzuordnen. Zahlreiche Studien zeigten jedoch, dass MHV-68 der intrinsischen und angeborenen Detektion nicht nur ausweicht, sondern auch gezielt die zellulären Signal- und Aktivierungswege in das virale System integriert, um die verschiedenen Abschnitte des eigenen Lebenszyklus zu koordinieren [Barton et al., 2007, Feng et al., 2007, Gray et al., 2010, Rodrigues et al., 2009, Tarakanova et al., 2007, Xie and Scully, 2007].

Adaptive Immunantwort Bereits frühe Studien mit MHV-68 konnten zeigen, dass einzelne Komponenten des Immunsystems des Wirtsorganismus nicht essentiell für die

Kontrolle der akuten lytischen Replikation sind [Übersichtsartikel Doherty et al., 2001, Stevenson et al., 2009, Virgin and Speck, 1999]. CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie B-Zellen und IFN- γ scheinen für die Infektion durch MHV-68 zunächst redundante Aufgaben zu übernehmen [Cardin et al., 1996, Lee et al., 2009, Tibbetts et al., 2002]. Während der latenten Phase, oder der Reaktivierung erlischt diese Redundanz, und die gesamten Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind zur erfolgreichen Immunkontrolle der Infektion notwendig [Übersichtsartikel Stevenson et al., 2009]. Dies unterstreicht die Annahme, dass akute und latente Infektion durch Gammaherpesviren separate immunologische Bereiche bilden [Barton et al., 2010]. Darüber hinaus kommt es durch die lebenslange Latenz und Reaktivierung zu einer chronischen Aktivierung von CD4+ und V β 4+ CD8+ T-Zellen des Wirtsorganismus. Dieser Aktivierung wird unter anderem auch die strikte Kontrolle der Reaktivierung zugeschrieben. Eine resultierende Hochregulation von MHC-II Molekülen auf Makrophagen simuliert permanente Entzündung und schützt dabei gleichzeitig vor Befall mit gram-negativen Bakterien [Barton et al., 2007, Haque et al., 2004]. Es wird daher postuliert, dass die Interaktion zwischen MHV-68 und dem adaptiven Immunsystem des Wirtes mehr symbiotisch als pathogen ist, und eine Gammaherpesvirusinfektion im Menschen unter Umständen ähnliche Effekte besitzen könnte [Barton et al., 2010]. Bei der Infektion von Mäusen ohne, oder mit eingeschränktem Immunsystem bilden sich jedoch, ähnlich zu EBV und KSHV, Tumore und Lymphome [Nash et al., 2001]. Darüber hinaus führt die unkontrollierte virale Replikation zu erhöhter Sterblichkeit durch Arteritis oder Multiorgan-Fibrose in bspw. IFN- γ Rezeptor *knock-out* Mäusen [Weck et al., 1997].

2 MicroRNAs (miRNAs) und kleine RNAs (sRNAs)

2.1 Einführung zu miRNAs und sRNAs

MicroRNAs bilden eine große post-transkriptionell regulierende Familie, die aus kleinen RNA Molekülen (small RNA, sRNA) von 19-30 Nukleotiden (nt) besteht. Sie wurden innerhalb der letzten zehn Jahre als Schlüsselregulatoren der Genexpression in Metazoen und Pflanzen beschrieben [Bartel, 2004, Krol et al., 2010]. In Säugetieren wird miRNAs zugeschrieben, die Aktivität von ungefähr 50% aller kodierenden Proteine zu regulieren [Krol et al., 2010]. MicroRNAs beeinflussen ein großes Spektrum an biologischen Prozessen wie z.B. Tier- und Pflanzenentwicklung, Proliferation und Differenzierung sowie Apoptose und Metabolismus [Huntzinger and Izaurralde, 2011, Krol et al., 2010, Voinnet, 2009]. Darüber hinaus bestehen Verbindungen zwischen miRNAs und der Pathogenese zahlreicher humaner Krankheiten wie Krebs und metabolischen Störungen [Carthew and Sontheimer, 2009, Krol et al., 2010]. Der Effekt von sRNAs, und im speziellen von miRNAs, auf die Genexpression ist grundsätzlich von inhibitorischer Natur. Die dazu notwendige enzymatische Maschinerie ist unter dem Begriff *small inhibitory RNAs* (siRNAs) erstmals von FIRE und MELLO in *C.elegans* beschrieben worden, und hatte einen revolutionären Einfluss auf die experimentellen Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression [Fire et al., 1998]. Die Autoren wurden dafür im Jahre 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Die Besonderheit von sRNAs ist, dass sie Faktoren darstellen, die gebunden an Effektorproteine ihre Zielstrukturen sequenzspezifisch erkennen. Mit Hilfe dieser Maschinerie kann die Zelle jederzeit spontan auf sich verändernde Umwelteinflüsse durch flexible Translationskontrolle reagieren [Carthew and Sontheimer, 2009]. Da miRNAs und siRNAs die gleichen zelluläre Proteine zur Prozessierung verwenden, sind nachfolgend die Beschreibungen gemäß der Literatur auf die miRNA-induzierte Prozessierung abgestimmt.

2.1.1 Biogenese und Prozessierung von miRNAs

MicroRNAs entstehen durch enzymatische Prozessierung von längeren Transkripten, die als Vorläufermoleküle (pri-miRNAs) durch RNA-Polymerase II von eigenständigen miRNA-Genen oder von *Introns* Protein-kodierender Gene entstehen [Kim, 2005, Okamura et al., 2007, Ruby et al., 2007]. Ebenfalls sind miRNA-Produkte bekannt, die aus Transkriptionseinheiten mit mehreren Produkten entstehen [Bartel, 2004]. Die pri-miRNAs falten eigenständig in eine räumliche Haarnadelstruktur (*hairpin-loop structure*), die als Substrat für zwei RNase III Enzyme dient (Drosha und Dicer). Drosha ist dabei das intranukleäre

Enzym und führt den ersten Schnitt durch. Nach Export der erzeugten 70 nt Vorstufe (pre-miRNA) in das Zytoplasma durch Exportin 5 erzeugt Dicer den 20 bp miRNA/miRNA* dsRNA (*double strand RNA*) Duplex. Ein Strang wird final als mature miRNA (*guide strand*) in den miRNA-induzierten *silencing* Komplex (miRISC) eingebaut, während der miRNA* (gesprochen: *miRNA star*) Strang entweder in einer geringeren Anzahl ebenfalls in RISC inkorporiert oder aber abgebaut wird (siehe Abbildung 6). Der *guide strand*, in Zusammenhang mit dem Effektorprotein Argonaut (AGO), erkennt über Basenpaarung nach Watson-Crick die Zielsequenz in der mRNA (*messenger RNA*). Die einzelnen Schritte der Biogenese unterliegen strenger Kontrolle und sorgen für eine genau regulierte Menge an produzierten und dann tatsächlich zur Inhibition verwendeten miRNAs [Siomi and Siomi, 2010].

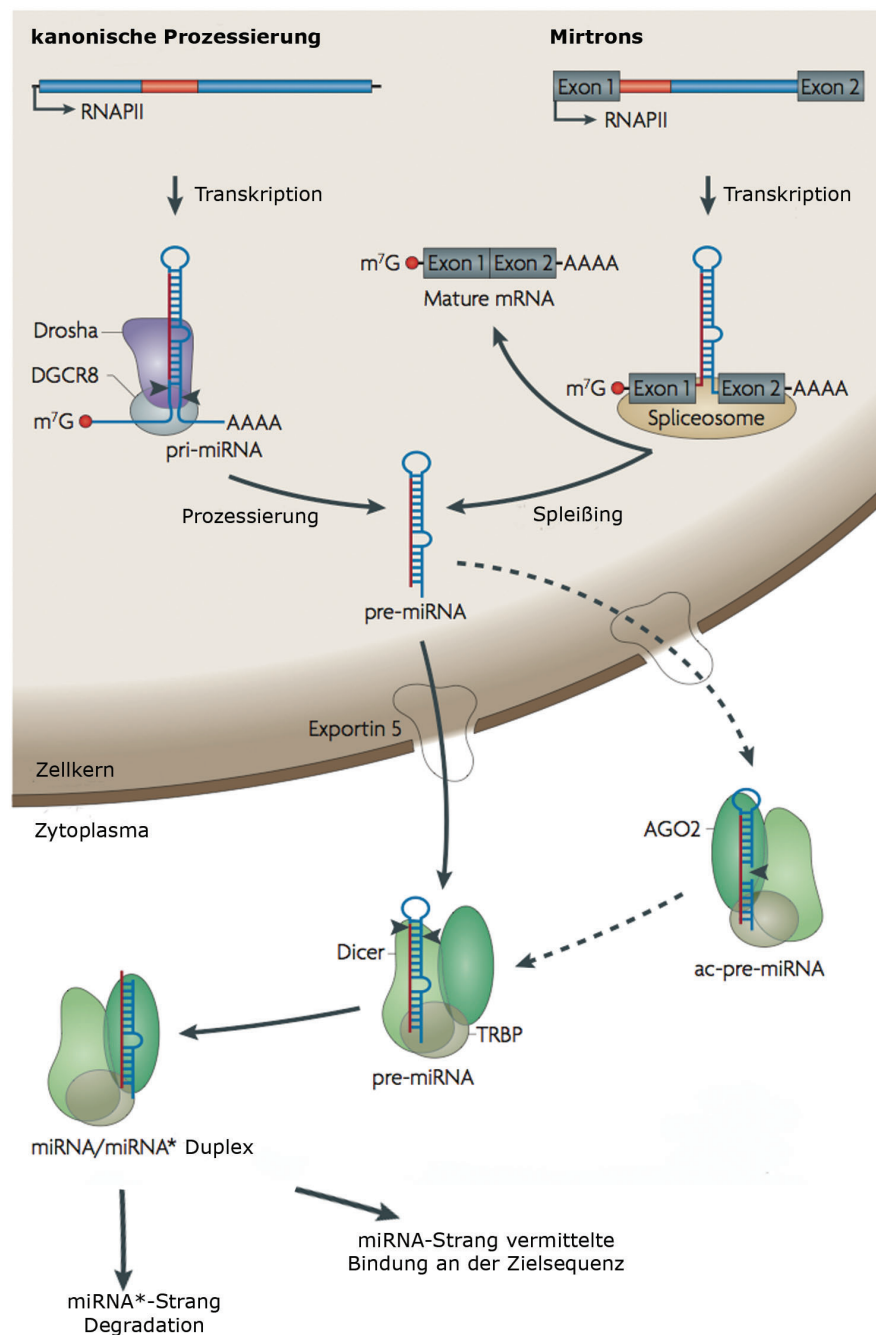


Abbildung 6: Biogenese von miRNAs: Der kanonische Weg über RNA-Polymerase II führt zu Primärtranskripten, die durch das RNase III Enzym Drosha intranukleär zur pre-miRNA (70 nt Vorstufe) prozessiert werden. Ebenfalls können aus gespleißten Introns pre-miRNAs entstehen. Diese werden durch Exportin 5 aus dem Kern transportiert. Im Zytoplasma wird durch das RNase III Enzym Dicer aus der pre-miRNA der miRNA/miRNA* Duplex. Geladen auf Argonaut 2 (AGO2) und durch Assoziation mit Dicer und TRBP kommt es zur Inkorporation in den RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISC) und Degradation des miRNA* Strangs. Entnommen aus Krol et al. [2010].

2.1.2 Droscha und Dicer - RNasen im Detail

Der erste Schnitt einer pri-miRNA durch Drosha ist der entscheidende, da durch ihn bestimmt wird, ob das Nukleotidmolekül als Substrat für die weiteren Enzyme der miRNA-Prozessierungsmaschinerie gilt. Über die dsRBD (dsRNA Bindedomäne) des Proteins DGCR8 werden die pri-miRNA Moleküle durch Drosha direkt am Stamm der Haarnadel gebunden (siehe Abbildung 6) [Han et al., 2006]. Die überlappenden ssRNA (*single strand RNA*) Segmente bestimmen den Abstand zwischen der Anker-Bindung am Stamm der Haarnadel durch DGCR8 und der Schnittstelle für Drosha. Dieser Abstand beträgt genau eine Windung einer dsRNA Helix (11 bp). Der erzeugte 2 nt Überhang am 3'-Strang bestimmt die pre-miRNA als Substrat für das zytoplasmatische Dicer, welches die weitere Entfernung des Haarnadel-Kopfes durchführt [Kim, 2005, Vermeulen et al., 2005]. Eine Unterdomäne von Dicer agiert hier ähnlich einem molekularen Lineal, welches das katalytisch aktive Zentrum für den Schnitt exakt zwei Windungen der dsRNA (22 bp) vom 3'-Überhang entfernt besitzt [Carthew and Sontheimer, 2009]. Damit ist die Länge einer maturen miRNA mit 22 nt definiert.

2.1.3 Argonaut und RISC-Etablierung

Eine Gemeinsamkeit der RNA-induzierten, sequenzspezifischen Inhibition von Transkripten ist das Zusammenwirken einer kleinen RNA Sequenz mit einem Effektorprotein der Argonaut Familie [Hutvagner and Simard, 2008]. In Menschen und Mäusen existieren vier Mitglieder der Argonaut Unterfamilie. Von diesen besitzt nur AGO2 eine funktionale RNase Domäne, welche als Endonuklease die Zielsequenz (mRNA *target*) schneiden kann. Dieser Prozess wird als *slicing* bezeichnet. Der Vorgang des *slicing* bedarf jedoch perfekter Komplementarität des *guide strands* zur Zielsequenz innerhalb des aktiven Zentrums der *Slicer*-Domäne von AGO2 [Chiu and Rana, 2002, Doench et al., 2003, Hutvagner and Zamore, 2002]. Eine imperfekte Komplementarität führt zur unabhängigen Repression der Transkripte (siehe Kapitel 2.1.4). Direkt nach Export der pre-miRNA in das Zytoplasma bildet sich der RISC-Lade-Komplex (RLC) aus Dicer, Argonaut und TRPB (mit einer dsRBD, doppelsträngige RNA-Bindungsdomäne) [Tomari and Zamore, 2005]. Zur Ausbildung des pre-RISC (Vorstufe des funktionalen RISC) erfolgt die Selektion des *guide* Stranges aus dem miRNA/miRNA* Duplex und die Freisetzung des *passenger* Stranges [Leuschner et al., 2006, Matranga et al., 2005, Miyoshi et al., 2005, Rand et al., 2005] sowie die Assoziation mit weiteren Proteinen wie Gemin-3, Gemin-4, Mov10, Imp8 und GW182 [Bartel, 2004, Liu et al., 2005, Meister et al., 2005, Till et al., 2007, Weinmann et al., 2009]. Lediglich die Bindung zu GW182 scheint essentiell für den letztendlich funktionalen RISC

zu sein [Carthew and Sontheimer, 2009, MacRae et al., 2008].

2.1.4 Effektorwirkung von miRNAs

MicroRNAs wirken regulatorisch durch eine Inhibition der Translation von mRNAs. Die eukaryotische Translation ist von der Wechselwirkung zwischen spezifischen Proteinen und Merkmalen der mRNA abhängig. Durch eine m⁷G(5′)-ppp(5′)N-Gruppe am 5′-Ende der mRNA und dem 3′-poly(A)-Schwanz können eukaryotische Initiationsfaktoren die mRNA erkennen. Dabei kommt es zur Bildung eines geschlossenen *mRNA-loops*, der die Bindung der ribosomalen Untereinheiten zur Translation erleichtert (siehe Abbildung 7 B) [Derry et al., 2006]. Durch diese räumliche Struktur wird aber auch die 3′-UTR zugänglich für regulative Bindungen. Die Region einer miRNA, die einer spezifischen Sequenz in der 3′-UTR, aber auch der CDS (*coding sequence*) komplett oder partiell komplementär sein muss, ist die *seed*-Sequenz (siehe Abbildung 7 A). In tierischen miRNA-Sequenzen wird diese vom 5′-Ende her durch die Nukleotide 2-7 gebildet. Vollständige Komplementarität der miRNA *seed*-Sequenz aktiviert das *slicing* der mRNA durch AGO2 und führt so zur direkten translationalen Inhibition. Dies ist in tierischen Zellen jedoch nur selten der Fall [Yekta et al., 2004]. Bei dem häufiger vorkommenden Fall der partiellen Komplementarität wird das *target* dem 5′-3′ mRNA *decay pathway* zugeführt und abgebaut. Dazu werden zuerst die mRNAs deadenyliert und im Anschluss von der 5′-cap befreit (*decapping*, siehe Abbildung 7 B) [Behm-Ansmant et al., 2006, Eulalio et al., 2007; 2009, Piao et al., 2010, Rehwinkel et al., 2005].

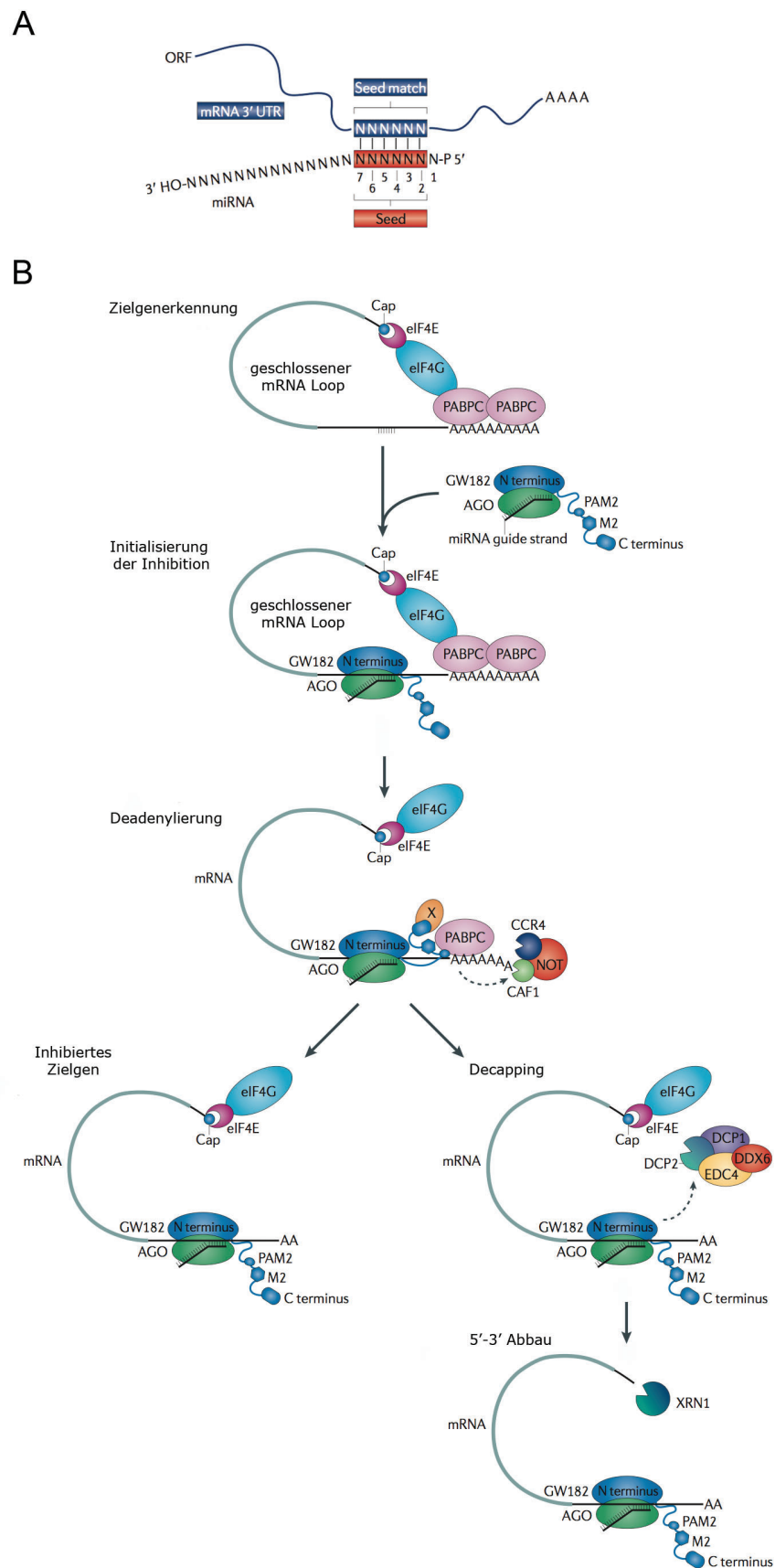


Abbildung 7: A) RNA-Zielsequenz-Erkennung in Tieren findet hauptsächlich in der 3'-UTR (*untranslated region*) eines Transkripts (mRNA) statt. Am 5'-Ende der miRNA befindet sich die *seed*-Sequenz, welche aus den Nukleotiden 2-7 besteht und die Hauptkomponente in der Zielsequenz-Erkennung bildet. B) Die Mindestanforderung für miRNA-induzierte Repression von Genexpression in Tieren ist die Ausbildung des AGO/GW182-Komplexes und die Bildung des *mRNA-loops*. Dadurch wird die kodierende Sequenz rezeptiver für das Ribosom, gleichzeitig ist die 3'-UTR aber auch zugänglicher für regulative Bindung. Durch Basenpaarung zur partiell- oder vollständig komplementären *seed*-Sequenz wird die mRNA entweder dem 5'-3' mRNA *decay pathway* zugeführt, oder durch die Endonukleaseaktivität von AGO2 direkt geschnitten (nicht gezeigt). Entnommen aus Huntzinger and Izaurralde [2011].

2.2 Virale MicroRNAs (vmiRNAs)

2.2.1 Einführung zu vmiRNAs

MicroRNAs, seien sie zellulär oder viral, besitzen auf die Entwicklung von mRNAs einen entscheidenden evolutiven Einfluss. Durch die positive Selektion von miRNA-Zielsequenzen kann die Genexpression post-translational gesteuert werden [Farh et al., 2005, Stark et al., 2005]. Dies stellt für Zellen eine Möglichkeit einer intrinsischen Abwehr von Fremd-Expression nach einer Infektion dar. Aber auch Viren nutzen die translationale Inhibition durch miRNAs für sich [Cullen, 2006]. Die Vorteile sind: 1) Sie sind hochspezifisch (sequenzabhängig). 2) Sie nehmen pro maturer miRNA unter 200 bp des viralen Genoms ein. 3) Sie sind nicht immunogen. Lediglich im Zytoplasma replizierende Viren (RNA-Viren) müssen auf ihre Verwendung verzichten, da wie bereits beschrieben die Effektorwirkung von miRNAs zytoplasmatisch erfolgt. Darüber hinaus ist die Wirkung von miRNAs abhängig von der Halbwertszeit des Proteins und der mRNA selbst. Die oben angeführten Vorteile können jedoch nicht vollständig von schnell lytisch replizierenden Viren ausgeschöpft werden. Viren mit einer längeren Verweildauer im Wirt, wie z.B. Herpesviren, können diese Möglichkeit des regulativen Eingriffes in die Genexpression der Wirtszelle aber sehr gut ausnützen.

2.2.2 MicroRNAs in Herpesviren

Die ersten viralen miRNAs wurden in EBV durch Klonieren der Fraktion der kleinen RNAs von Zellen aus Burkitt's Lymphomen gefunden [Pfeffer et al., 2004]. Kurze Zeit später konnten für weitere Herpesviren miRNAs identifiziert werden [Pfeffer et al., 2005]. Von mittlerweile 234 bekannten viralen miRNAs sind 227 den HV zuzuordnen (siehe Tabelle 2) [Lieber and Haas, 2011]. Diese zeigen jedoch, bis auf eine Ausnahme von acht zwischen EBV und seinem nächsten Verwandten RLCV (*Rhesus Lymphocryptovirus*) konservierten miRNAs, untereinander keine Sequenzübereinstimmung [Cai et al., 2006, Grundhoff et al., 2006, Pfeffer et al., 2005]. Zelluläre miRNAs hingegen weisen ca.

30% Sequenzübereinstimmung zwischen den Spezies auf [Boss et al., 2009]. Dies führte zur Annahme, dass auf Grund der evolutiven Anpassung der HV an den Wirt nicht die Sequenz, sondern die Funktion konserviert sein könnte [Sood et al., 2006]. Die Anordnung der viralen miRNAs auf den Genomen ist entweder einzeln oder als *Cluster* ebenfalls unterschiedlich (siehe Abbildung 8). Die Transkription der viralen miRNAs erfolgt in der Regel, ähnlich zu den zellulären miRNAs, durch RNA-Polymerase II. Eine Ausnahme stellt jedoch die Strategie von MHV-68 dar, welches über die tRNA-miRNA Struktur des Primärtranskripts (siehe Abbildung 8) die Expression über RNA-Polymerase III steuert (siehe Kapitel 2.2.3). Bislang sind keine viralen Proteine zur Bildung maturer miRNAs bekannt.

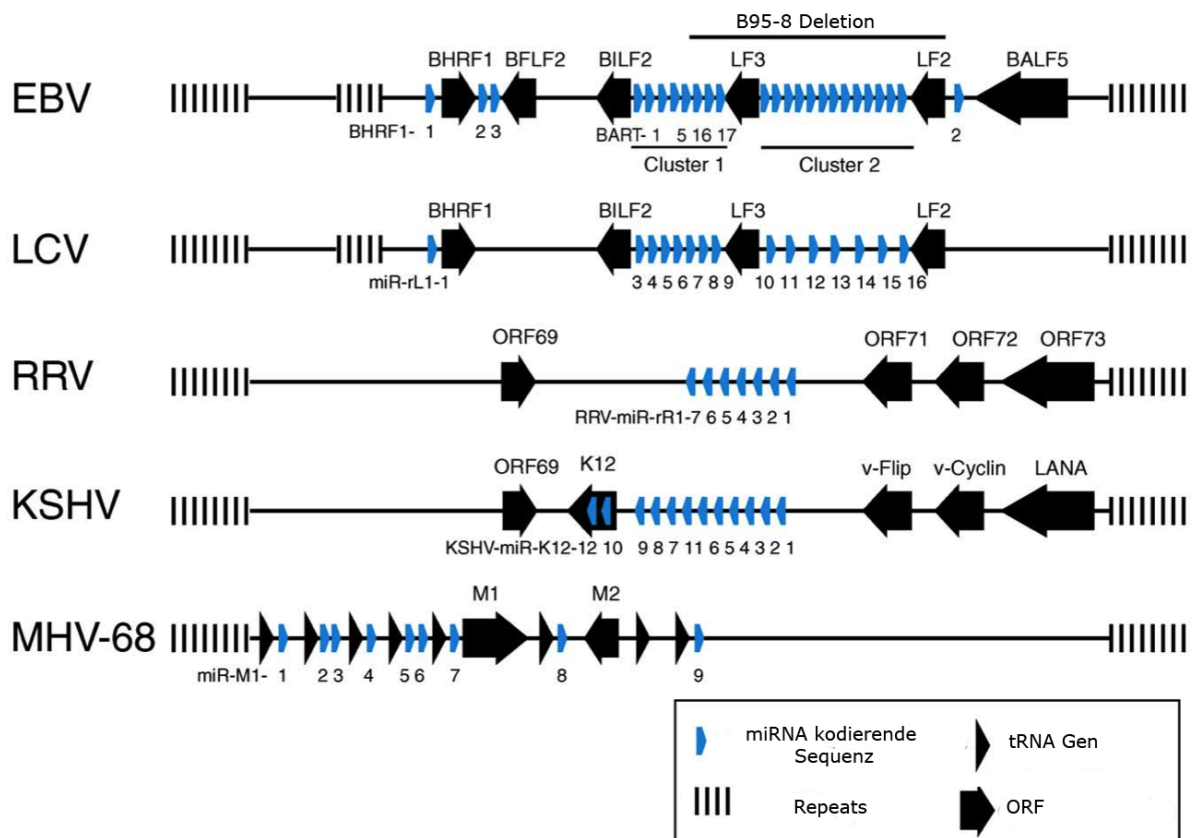


Abbildung 8: Anordnung von viralen miRNAs in den Genomen von verschiedenen Gammaherpesviren. Die Transkription bei EBV, LCV, RRV und KSHV erfolgt über RNA-Polymerase II, während über die tRNA-miRNA (schwarze Dreiecke) Struktur diese bei MHV-68 durch RNA-Polymerase III erfolgt. Entnommen aus Boss et al. [2009].

2.2.3 Prozessierung der viralen tRNAs und miRNAs von MHV-68

MHV-68 kodiert für acht virale tRNAs [Bowden et al., 1997]. Diese tRNA-Moleküle sind als nicht essentiell für die lytische Replikation wie auch für die Latenz eingestuft [Simas

Spezies	Wirt	Haarnadel Vorprodukt	Mature miRNAs
Alle Einträge	-	15 172	17 341
<i>H. sapiens</i>	-	1048	1223
<i>M. musculus</i>	-	672	1055
Alle Viren	versch.	234	377
Herpesviren	versch.	227	365
<i>HSV-1</i>	Mensch	16	25
<i>HSV-2</i>	Mensch	18	24
<i>HCMV</i>	Mensch	11	17
<i>EBV</i>	Mensch	25	44
<i>KSHV</i>	Mensch	12	24
<i>MCMV</i>	Maus	18	29
<i>MHV-68</i>	Maus	9*	10*
<i>LCV, RLV</i>	Affe	36	48
<i>RRV</i>	Affe	7	11
<i>BoHV-1</i>	Rind	10	12
<i>MDV</i>	Geflügel	14	26
<i>MDV-2</i>	Geflügel	18	36
<i>ILTV</i>	Geflügel	7	10
<i>HVT</i>	Geflügel	17	28

Tabelle 2: Aktuelle Anzahl der maturen miRNAs und ihrer Vorprodukte aus den Eintragungen von miRBase (Stand: Dezember 2010, *Release 16*), einer *online* Datenbank zur Übersicht aller miRNAs einer Spezies. Entnommen aus Lieber and Haas [2011]. *) Stand: September 2008, *Release 12*

et al., 1998]. Ihre Funktion ist bis heute ungeklärt. Durch ihre permanente Expression dienen sie als zuverlässiger *Marker* für die Latenz [Bowden et al., 1997]. Bei der Identifizierung von viralen miRNAs der Familie der Herpesviren wurden die miRNAs von MHV-68 am linken Genomende (0-6 kb) nicht nur in räumlicher Nähe zu den tRNAs gefunden, sondern auf den gleichen Primärtranskripten (siehe Abbildung 9 A und B) [Pfeffer et al., 2005]. Wie bereits erläutert, werden diese durch RNA-Polymerase III (RNA-Pol III) erzeugt. Die Transkription über RNA-Polymerase III ist in der Regel weniger stark reguliert und bedarf nur weniger regulatorischer Kofaktoren. Sie ist eng mit Zellwachstum, Zellzyklus und den damit verbundenen *housekeeping* Genen zur Bereitstellung von ribosomaler RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) und anderen kleinen RNAs verbunden. Dies führt bei den vtRNA-miRNA Primärtranskripten von MHV-68 zur typischen Kleeblattstruktur der tRNAs und dem Haarnadel-*loop* mit der viralen miRNA (siehe Abbildung 9 B). Im Gegensatz zu zellulären oder anderen viralen miRNA-Primärtranskripten umgeht MHV-68 dadurch den ersten Schritt der Reifung von miRNAs durch Drosha. Stattdessen trennt das Enzym tRNaseZ die vtRNA von der miRNA ab, und stellt damit

die pre-miRNA für die weitere Reifung auf normalem Weg (Exp5 - Dicer) bereit (siehe Abbildung 9 C) [Bogerd et al., 2010]. Somit sind zwei regulatorische Weichen der Wirtszelle zur Prozessierung von miRNAs ausser Kraft gesetzt (Expression und Aktivierung für die si/miRNA-Maschinerie, siehe Siomi and Siomi [2010]). Ob dieser alternative Weg für zelluläre oder miRNAs anderer Viren ebenfalls Anwendung findet, ist jedoch noch unklar.

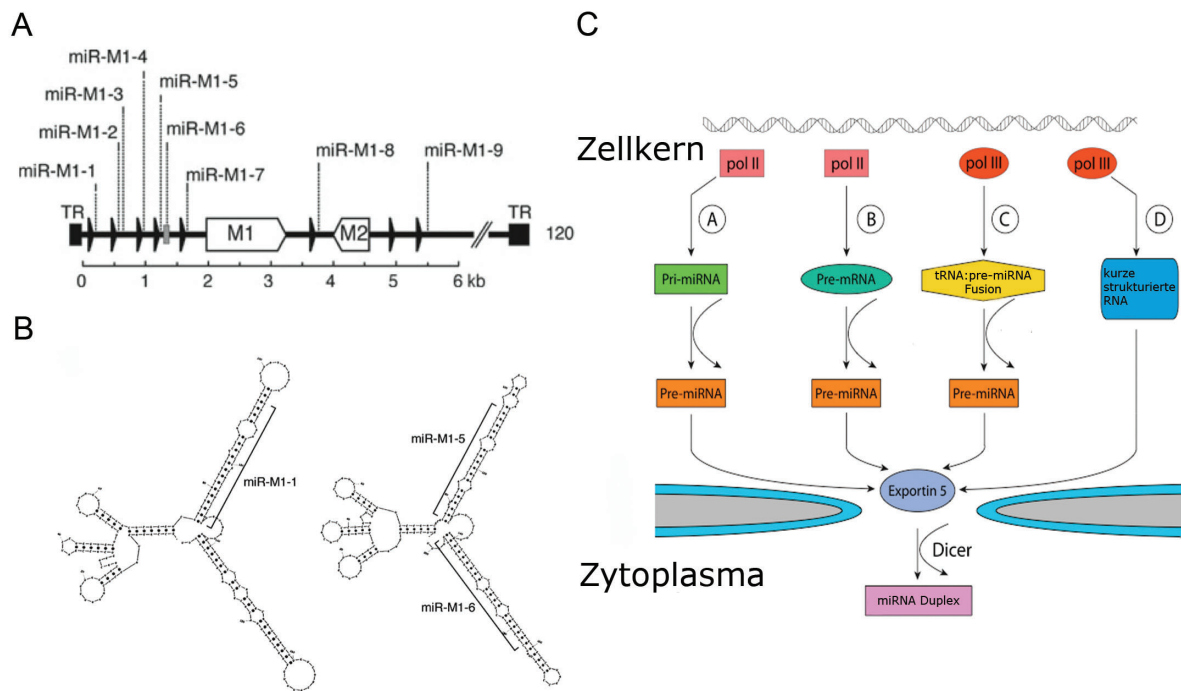


Abbildung 9: A) Die miRNAs von MHV-68 befinden sich am linken Genomende innerhalb der ersten 6 Kilobasen. Die neun Transkripte der miRNAs entstehen aus den Sequenzen der acht viralen tRNAs (schwarze Dreiecke). B) Durch RNA-Polymerase III getriebene Transkription entstehen Primärtranskripte, die die charakteristische Kleeblatt-Struktur für tRNAs und jeweils die Haarnadel-loops für die viralen miRNAs aufweisen. Das Muster ist dabei jeweils vtRNA-miRNA. C) Durch die Besonderheit der Assoziation der viralen miRNAs mit den vtRNAs erfolgt die Transkription nicht über die kanonischen Wege RNA-Pol II (a und b), sondern über RNA-Pol III (c). Damit erfolgt die initiale Prozessierung durch das Enzym tRNaseZ. Die weitere Prozessierung erfolgt über den kanonischen Weg, Exportin 5 und Dicer. A) und B) Entnommen aus Pfeffer et al. [2005]; C) Entnommen aus Cullen [2011].

2.2.4 Identifizierung von weiteren viralen miRNAs

Durch neue und verbesserte Methoden wurden weitere Untersuchungen zur Identifizierung von bisher unbekannten viralen und zellulären miRNAs möglich. Bei den Hochdurchsatz-Sequenzierungen (*deep sequencing*, wie z.B. 454 und Solexa) sind Charakteristika zur Erkennung von authentischen miRNA-Kandidaten notwendig. Bei einer Sequenzierung können weit mehr als 5 Millionen *reads* von sRNA Sequenzen entstehen. Die Bezeichnung *read* beschreibt dabei die Anzahl der erhaltenen Sequenzen aus einer Probe. Eine Aussage über die Häufigkeit einer miRNA in der Zelle oder über eine biologische Relevanz ist damit

aber nicht möglich [Cullen, 2011]. Um erhaltene Kandidaten distinkter zu definieren gelten nach Cullen [2011] folgende Kriterien:

1. Sie sollten von einer klar definierten Region des viralen Genoms stammen und eindeutig oberhalb des Signal-Rausch Verhältnisses stehen.
2. Ihre Länge sollte innerhalb von 21 - 23 nt (maximal 19 - 25 nt) liegen.
3. Auf Grund der Bedeutung der *seed*-Region einer miRNA sollte das 5'-Ende innerhalb der *reads* konsistent sein.
4. Da der miRNA-Duplex beiden Strängen die Möglichkeit zur Reifung offen lässt, sollten beide Stränge detektiert werden. Darüber hinaus sollte auch das ca. 80 nt lange Vorprodukt auftreten.

2.2.5 Identifizierung von mRNA Zielsequenzen für virale miRNAs

Für die Identifizierung von Zielsequenzen (*targets*) für miRNAs sind viele experimentelle oder bioinformatische Ansätze bekannt [Bartel, 2009, Li et al., 2010, Rajewsky, 2006]. Die meisten bioinformatischen Algorithmen verwenden die Watson-Crick Bindung der *seed*-Sequenz mit der *target-site* als Grundlage der Vorhersage [Baek et al., 2008, Selbach et al., 2008]. Die bekanntesten sind miRanda, PICTAR, TargetScan, PITA und RNAHybrid [Enright et al., 2003, Kertesz et al., 2007, Krek et al., 2005, Lewis et al., 2003, Rehmsmeier et al., 2004]. Ihre Vorhersage-Wahrscheinlichkeit ist abhängig davon, ob sie sich strikt auf eine komplette Komplementarität der *seed*-Sequenz begrenzen (7mer-A1/7mer-m8 *sites*) oder *whobble basepairing* und partielle Komplementarität (6mer/mismatch) erlauben (siehe Abbildung 10). Durch Anpassungen an verschiedene Eigenschaften des miRNA/mRNA-Duplexes wie Komplementarität, Thermodynamik, Konservierung und ihre verschiedene Gewichtung untereinander wird die Vorhersageleistung verbessert [Zhang and Verbeek, 2010]. Eine systematische Validierung der Vorhersage ist bislang auf Grund fehlender experimentell bestätigter Targetome nicht möglich. Um falsch-positive wie auch falsch-negative Zielgene zu vermeiden, sind experimentelle Ansätze zur Bestätigung und Validierung notwendig. Da miRNAs die Stabilität von mRNAs beeinflussen, sind Veränderungen im Transkriptom durch Überexpression oder *knock-out* von miRNAs durch Mikroarray-Analyse sichtbar. Da diese Änderungen jedoch direkter wie auch indirekter Natur sein können, muss das Ergebnis eines Mikroarrays entweder durch die oben beschriebenen bioinformatischen Hilfsmittel validiert, oder mittels weiterer experimenteller Ansätze detaillierter betrachtet werden. Letztere basieren z.B. auf der biologischen Assoziation von miRNA/mRNA-Duplex und AGO-Protein. Durch eine Immunopräzipitation des RISC

A

7mer-A1 site

ORF NNNNNNA Poly(A)

Seed match +
A at position 1

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' miRNA

8 7 6 5 4 3 2 1

Seed

7mer-m8 site

ORF NNNNNNN Poly(A)

Seed match +
match at position 8

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' miRNA

8 7 6 5 4 3 2 1

Seed

8mer site

ORF NNNNNNNNA Poly(A)

Seed match +
A1 and m8

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' miRNA

8 7 6 5 4 3 2 1

Seed

B

6mer site

ORF NNNNNN Poly(A)

Seed match

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' miRNA

8 7 6 5 4 3 2 1

Seed

Offset 6mer site

ORF NNNNNNN Poly(A)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' miRNA

8 7 6 5 4 3 2 1

Seed

Abbildung 10: A) Die Restriktion auf kanonische *target*-Bindemöglichkeiten von miRNAs ergibt bei bioinformatischen Vorhersagen eine höhere Wahrscheinlichkeit auf Bindeereignisse. B) Weniger häufige *target*-Bindemöglichkeiten erhöhen für Algorithmen die Sensitivität und können daher eine Vielzahl an falsch-positiven miteinbeziehen. Entnommen aus Bartel [2009].

3 Zielsetzung der Arbeit

MHV-68 ist ein ideales Modell zur Untersuchung der Funktion von miRNAs während einer Infektion mit Gammaherpesviren. Es erlaubt *in vitro* und *in vivo* Infektionen und führt so zu einer physiologischeren Betrachtung der Funktion der miRNAs während der einzelnen Schritte im Lebenszyklus von γ -HV. Durch die Identifizierung von miRNAs in HV durch Pfeffer et al. [2005] war die Virologie um einen zellbiologischen Aspekt reicher. Die ersten neun miRNAs in MHV-68 sind durch Klonierung der Fraktion der sRNAs gefunden worden. Nach Betrachtung der Primärtranskripte (siehe Abbildung 9, Seite 23) stellte sich aber für zahlreiche vtRNA-miRNA Strukturen die Frage, weshalb sich zwei Haarnadel-*loops* ausbilden, die aber nur zu einer maturen miRNA führen. Darüber hinaus waren keine zellulären oder viralen *targets* der miRNAs von MHV-68 bekannt. In dieser Arbeit untersuchte ich deshalb, ob a) die neun publizierten miRNAs das volle miRNA Kodierungspotential von MHV-68 darstellen, und b) welche Zielsequenzen unter ihre Regulation fallen (*target*-Identifizierung). Für a) wurde die Technologie der Hochdurchsatz-Sequenzierung (454) von sRNA Fraktionen verschiedener mit MHV-68 infizierter Zelllinien verwendet. Dies sollte zum einen die bereits bekannten miRNAs bestätigen und weitere miRNA-kodierende *loci* auf dem Genom von MHV-68 identifizieren. Zur Identifizierung von Zielsequenzen (b) war eine Kombination von bioinformatischen Vorhersagen und experimentellen Ansätzen notwendig. Dazu verwendete ich das genetisch veränderte MHV-68 Δ 1-9, welchem die zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit bekannten miRNAs mghv-mir-M1-1 bis -9 fehlen. Im Vergleich zu Wildtyp MHV-68 Infektionen von Zelllinien *in vitro* sollte in Mikroarray-Analysen die unterschiedliche Genexpression untersucht werden. Für spätere *in vivo* Anwendungen mussten die Viren intensiv in ihrem Wachstumsverhalten und der Expression von miRNAs in den verschiedenen Zelllinien charakterisiert werden. Durch einzelne weitere experimentelle Ansätze (RIP-CHIP, *Nanostring*) sollten die so erhaltenen Kandidaten für eine zelluläre vmiRNA Zielsequenz weiter eingegrenzt und validiert werden. Eine funktionale Beschreibung der Kandidaten sollte dann durch Verwendung der *target*-Sequenzen in einem Luciferase-Assay erfolgen.

Teil II

Material und Methoden

4 Material

4.1 Eukaryotische Zellen

BHK-21:	Baby Hamsternieren-Fibroblasten (ATCC CCL-10)
NIH3T3:	Swiss-Mausembryo-Fibroblasten (ATCC CRL-1658)
MEF:	Mausembryo-Fibroblasten
MEF Dicer -/-:	Mausembryo-Fibroblasten Dicer Knock-out (freundlicherweise bereitgestellt durch K. Höfig, Helmholtz Zentrum München, Deutschland)
MLE-12:	Alveoläre Maus Lungen-Epithelzellen (ATCC CRL-2110)
S11:	Lymphoide Maus B-Zelllinie, persistent infiziert mit MHV-68 (freundlicherweise bereitgestellt durch J.P. Stewart, Universität Liverpool, UK)
Ag8:	Maus B-Zelllinie (ATCC CRL-1580)
HEK293:	Humane Embryonale Nierenzellen (ATCC CRL-1573)

4.2 Bakterien

<i>E.coli</i> DH10B	F-mcrA δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ δ M15 lacX74 recA1 endA1 ara δ 139 δ (ara,leu)7697 galU galK δ -rpsL(StrR) nupG
<i>E.coli</i> DH5 α	fhuA2 δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Σ 80 δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

4.3 Viren

Die für diese Arbeit verwendeten Viren sind MHV-68 Wildtyp (WT) (entspricht dem von Blas-kovic et al. [1980] isolierten Virus Klon G2.4 von A. Nash (Universität Edinburgh, UK)) und Wildtyp WT-D8J3 (entspricht dem von Adler et al. [2000] durch BAC-Klonierung erhaltenen Virus). Diese beiden Viren unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der 40bp-*Repeats*, die bei WT-D8J3 reduziert sind [Thakur et al., 2007]. Im Virus Δ 1-9 wurden die ersten fünf vtRNAs inklusive der vor dieser Arbeit bekannten sieben (mghv-mir-M1-1 bis mghv-mir-M1-7 5p) *en bloc*,

und damit gleichzeitig die in dieser Arbeit neu identifizierten drei miRNAs (mghv-mir-M1-10 bis mghv-mir-M1-12) deletiert. Die Sequenzen für die miRNAs mghv-mir-M1-8 und mghv-mir-M1-9 wurden mit dem *site-directed mutagenesis* Kit (Stratagene) in $\Delta 1-9$ subtil deletiert. Da die Herstellung der Mutante $\Delta 1-9$ vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurde, bestand die Annahme eine vollständige Deletion der viralen miRNAs durchgeführt zu haben. Die Mutante $\Delta 1-9$ besitzt jedoch noch die durch diese Arbeit identifizierten miRNAs mghv-mir-M1-13 bis mghv-mir-M1-15. Die Revertante ($\Delta 1-9$ Rev) hat die der Mutante $\Delta 1-9$ fehlenden Sequenzen an der *BglII*-Schnittstelle (Genomkoordinate 3846; GenBank *U97553*) wieder inseriert (schematische Darstellung siehe Abbildung 11).

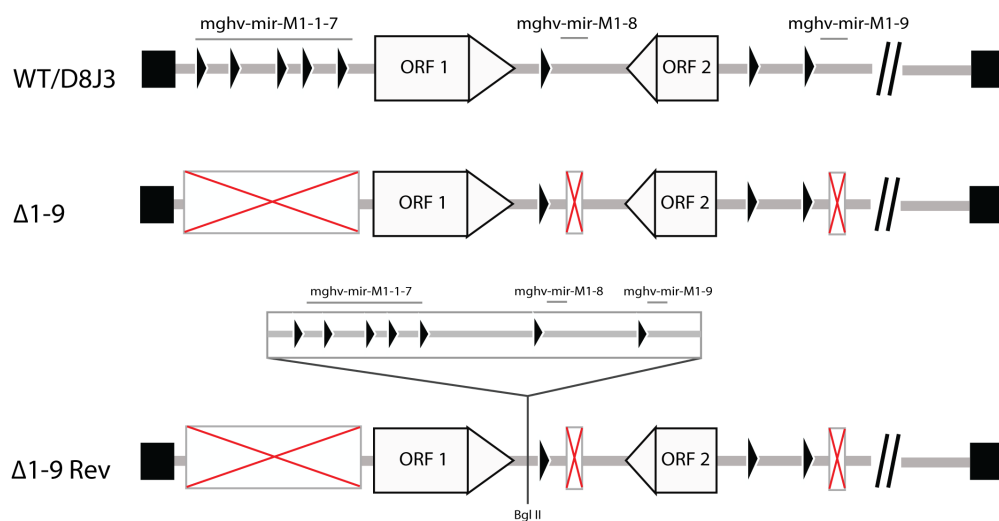


Abbildung 11: Schematische Darstellung der für diese Arbeit verwendeten MHV-68. Wildtyp (WT) und das BAC-generierte WT-D8J3 (D8J3) beinhalten alle viral kodierten miRNAs. Der *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$ wurden die ersten fünf vtRNAs und mit ihnen die miRNAs mghv-mir-M1-1 bis -7 und mghv-mir-M1-10 bis -12 *en bloc*, und die Sequenzen für miRNAs mghv-mir-M1-8 und mghv-mir-M1-9 subtil deletiert. Der Revertante ($\Delta 1-9$ Rev) wurden in die *BglII* Schnittstelle (Genomkoordinate 3846; GenBank *U97553*) die Sequenz für die ersten fünf vtRNAs mit den miRNAs, sowie die Sequenzen für die miRNAs mghv-mir-M1-8 und mghv-mir-M1-9 wieder eingefügt. Zeichenerklärung: vtRNAs (schwarze Dreiecke), terminale *repeats* (schwarze Vierecke)

4.4 Plasmide

pUC19	<i>E.coli high-copy</i> Plasmid; Resistenz: Ampicilin
pST76 K-SR	<i>Shuttle</i> -Vektor für RecA-abhängige BAC-Mutagenese; Resistenz: Kanamycin
psiCHECK-2	Luciferase-Assay Vektor mit interner Kontrolle durch Renilla-Luciferase; Resistenz: Ampicilin
pSG5	Klonierungsvektor; Resistenz: Ampicilin

4.5 Nährmedien

4.5.1 Nährmedien für Zellkultur

S11/Ag8	RPMI-1640 10% FCS (bei 56°C inaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 50 μ M β -Mercaptoethanol
NIH3T3/MLE-12	Dulbeccos-MEM 10% FCS (bei 56°C inaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin
MEF/Dicer -/- MEF	Dulbeccos-MEM 10% FCS (bei 56°C inaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin
BHK-21	Glasgow-MEM 5% FCS (bei 56°C inaktiviert) 5% Tryptosephosphatbroth (TPB) 1% Penicillin/Streptomycin
HEK293	RPMI-1640 10% FCS (bei 56°C inaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin
Einfriermedium	90% FCS (bei 56°C inaktiviert) 10% DMSO

4.5.2 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium	1% Caseinextrakt 0,5% Hefe Extrakt
-----------	---------------------------------------

	0,5% Natriumchlorid
	0,1% Glukose, pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Agar
LB-Agar/LB-Medium + Antibiotika	
+Amp	100 $\mu\text{g/ml}$
+Kan	50 $\mu\text{g/ml}$
Einfriermedium	50% Glyzerinlösung

4.6 Antibiotika

Ampicillin (Amp)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Kanamycin (Kan)	Piogene (Cambridge, UK)
Penicillin (Pen)	Cambrex, BioWhittaker (Verviers, Belgien)
Streptomycin	Gibco/BRL (Eggenstein, Deutschland)

4.7 Antikörper

α -AGO2 (6F4, Maus)	Monoklonaler Antikörper, bereitgestellt durch E. Kremmer (Helmholtz Zentrum München, Deutschland)
α -AGO2 (2D4, Maus)	Monoklonaler Antikörper, Kreuzreaktion zu AGO2 von Ratte und Hamster, WAKO Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)
α -BrDU (ab1893)	Polyklonaler Antikörper (Schaf) gegen Bromodeoxyuridin, abcam (Cambridge, UK)

4.8 Enzyme

Alkaline Phosphatase	NEB (Schwalbach, Deutschland)
Klenow-Fragment	NEB (Schwalbach, Deutschland)
Taq-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
RNase A	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Restriktionsenzyme	NEB (Schwalbach, Deutschland)
DNA-Ligase (T4)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

4.9 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

- *Stem-loop* RT-PCR zur Detektion von viralen miRNAs (5'-3'):

SLP_mghv-mir-1	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAGGA
SL_mghv-mir-1.for	CGGCTAGAAATGGCCGTACT
SLP_mghv-mir-2	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAGAG
SL_mghv-mir-2.for	CAGACCCCTCTCCCC
SLP_mghv-mir-3	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAGCGC
SL_mghv-mir-3.for	CGGAGGTGAGCAGGAGTT
SLP_mghv-mir-4	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACTAGAAT
SL_mghv-mir-4.for	CCTCGAGGAGCACGTGTT
SLP_mghv-mir-5	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACGAGACG
SL_mghv-mir-5.for	CGCAGAGTTGAGATCGGGT
SLP_mghv-mir-6	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAACC
SL_mghv-mir-6.for	CGGCTGAAACTGTGTGAGGT
SLP_mghv-mir-7 5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAGGTTA
SL_mghv-mir-7 5p.for	CTAAAGGTGGAGGTGCGG
SLP_mghv-mir-7 3p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAATAAA
SL_mghv-mir-7 3p.for	CCGATATCGCGCCCACC
SLP_mghv-mir-8	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACGACCAA
SL_mghv-mir-8.for	CTAGCACTCACTGGGGT
SLP_mghv-mir-9	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAAAG
SL_mghv-mir-9.for	CCGTACATTTGCCTGGAC
SLP_mghv-mir-10	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAAGA
SL_mghv-mir-10.for	CCGGTGATTACACGGAAGGT
SLP_mghv-mir-12	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAGGG
SL_mghv-mir-12.for	CTTTGGTGTGGGAGTCCTAC
SLP_mghv-mir-13	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAGAA
SL_mghv-mir-13.for	CGCGTATCTCATGTGAGCTC
SLP_mghv-mir-14	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACAAAACG
SL_mghv-mir-14.for	CGTGCTACAGCGTCAGAA

- Zelluläre miRNAs und andere Kontrollen für *stem-loop* RT-PCR (5'-3'):

SLP_snRNA-U6-K	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACTGTGCT
SL_snRNA-U6-K.for	CCGGCTCGCTTCGGC
SLP_mmu-mir-191-K	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACCAGCTG
SL_mmu-mir-191-K.for	CGGCAACGGAATCCCAAAAG

SLP_rRNA-5.8s-K	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACAGCGAC
SL_rRNA-5.8s-K.for	GCCCGCCTGTCTGAGC
SLP_mir-155	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACACCCCT
SL_mir-155.for	GGCCGTTAATGCTAATCGTGAT
SLP_mir-16	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCGCCAA
SL_mir-16.for	GCCGCTAGCAGCACGTAAATA
SLP_mir-15b	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCTGTAAA
SL_mir-15b.for	GCCTAGCAGCACATCATGG
SLP_mir-199a3p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCTAACCA
SL_mir-199a3p.for	CGGCACAGTAGTCTGCACAT
SLP_mir-26a	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACAGCCTA
SL_mir-26a.for	CCGCGTTCAAGTAATCCAGGA
SLP_mir-26b	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACACCTAT
SL_mir-26b.for	GCCCGTTCAAGTAATTCAGG
SLP_mir-24	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCTGTTC
SL_mir-24.for	GCTGGCTCAGTTCAGCAG
SLP_mir-125a5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCTCACAG
SL_mir-125a5p.for	GGTCCCTGAGACCCTTTAAC
SLP_mir-125b5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACCAGAGCCAACCTCACAA
SL_mir-125b5p.for	CGTCCCTGAGACCCTAAC

- Universeller *Reverse*-Primer für *stem-loop* RT-PCR (5'-3'):

SL_uniREV.rev	GTGCAGGGTCCGAGGT
---------------	------------------

- Primer für Genexpressionsanalysen durch RT-PCR (5'-3'):

BRCA1-p1 (Maus).for	TTGTGAGCGTTTGAATGAGG
BRCA1-p1 (Maus).rev	CTGTCCTTCAAGGTGGCATT
BRCA1-p2 (Maus).for	CAAGGCGAGAGCTAGAAGGA
BRCA1-p2 (Maus).for	AATGTGGGCTGGCTCTTTAG
18S rRNA (Maus).for	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S rRNA (Maus).rev	GCTGGAATTACCGCGGCT
mgHV-M1.for	ATCTCACCTTTGCTGGATTCTTATTTGC
mgHV-M1.rev	GTTCTGATGGCTTGAAACGATGGC
mgHV-M2.for	TCCTCGCCCCACTCCACAAAAC
mgHV-M2.rev	AACACCCCATGAACCCTGAGATACG

mgHV-M3.for	GCTTGCTGGATGGTCTCACAGG
mgHV-M3.rev	TAAGATGAACACTTGCCCATGCTACTAC
mgHV-M4.for	CCTCGGCATGGGATAACTATACTTCTG
mgHV-M4.rev	GCTGTGTGGCATTGTAACCTCTTG
mgHV-M5.for	ACACCAACGGGACCCTCCATTC
mgHV-M5.rev	ACACAGGTAGGACCAACCAGTATGC
mgHV-M6.for	ACACCAACGGGACCCTCCATTC
mgHV-M6.rev	ACACAGGTAGGACCAACCAGTATGC
mgHV-M7.for	TGTGTGGCGTTAAATCCCTAGCAAAG
mgHV-M7.rev	GGCACCATACTAAGTTGTGATTCCC
mgHV-M8.for	GGGATGTGGTGTACGAACCTGAC
mgHV-M8.rev	CAGAGGAGAGTTGTGGACAATTTAG
mgHV-M9.for	TCCCTCCGTCAAATGCTCCAGAAG
mgHV-M9.rev	ACACATTGCCTACATTGGTAAACAAGAAAG
mgHV-M10c.for	CACAGCAGAGGTCCGTCCAGTAG
mgHV-M10c.rev	CCTCCTTACCTGTTGATACCTTTTGCG
mgHV-M11.for	ATAATAACATTGACCCAGGAGTTTAGAAGG
mgHV-M11.rev	AACGAGGTGAAAAGTTTGACAGG
mgHV-M12.for	GGGAAGGGTGGAAGACGCTCAG
mgHV-M12.rev	CTGGCAGGGAGGCTGGAGATG
mgHV-M13.for	GGCAGGCAGGCACCAACAG
mgHV-M13.rev	GGGGAGGGGAGGCACTGG
mgHV-ORF4.for	CCTCAAATGCCACACTAACATCTCC
mgHV-ORF4.rev	GAGTCACGGTTGTCCACATATTATCCC
mgHV-ORF50.for	CCCACGGTTCGCTATACAGTAAAGAC
mgHV-ORF50.rev	ATTGTGTAGAGGGTCCAGGTTAATGATTTTC
mgHV-ORF72.for	TTCATCGAAAGAGACAATGGCAATATCTAC
mgHV-ORF72.rev	GTGTGTGCAAAAGCCTCTATATAACCAAG
mgHV-ORF73.for	TGGTGGAGGAGGGGCTGGTC
mgHV-ORF73.rev	ACCGACTACACGCAACACAACC
mgHV-ORF74.for	TGTAGCATTGGTTGACGAGGTTGTG
mgHV-ORF74.rev	AACTGCCCTCCTGACAGATTCTCC
mgHV-K3.for	TCACACACCCAGTCTACAACAGG
mgHV-K3.rev	ACCTTGGATTAGCCCGTGAGACC
L8 (Maus).for	CAGTGAATATCGGCAATGTTTTG
L8 (Maus).rev	TTCACCTCGAGTCTTCTTGGTCTC

- *Northernblot*-Sonden auf virale miRNAs (5'-3'):

mgHV-mir-M1-1	AAAGGAAGTACGGCCATTTCTA
mgHV-mir-M1-2	ACAGACCACACACTCCCCCTCT
mgHV-mir-M1-3	AAGCGCAACTCCTGCTCACCTC
mgHV-mir-M1-4	TAGAATAACACGTGCTCCTCGA
mgHV-mir-M1-5	GAGACGACCCGATCTCAACTCT
mgHV-mir-M1-6	AAAACCACCTCACACAGTTTCA
mgHV-mir-M1-7 5p	AGGTTACCGCACCTCCACCTTT
mgHV-mir-M1-7 3p	AATAAAGGTGGGCGCGATATC
mgHV-mir-M1-8	GACCAAACCCCCAGTGAGTGCT
mgHV-mir-M1-9	AAAAAGGTCCAGGCAAATGTGA
mgHV-mir-new1 3p (M1-10)	AAAGAACCTTCCGTGTAATCA
mgHV-mir-new2 3p (M1-11)	GACAGCTGTCAGGGGTACA
mgHV-mir-new3 3p (M1-12)	GCGTCGGGACCCGGGA
mgHV-mir-new4 3p (M1-13)	AAAGGGGTAGGACTCCCACACCAA
mgHV-mir-new5 3p (M1-14)	AAAGAAGAGCTCACATGAGATA
mgHV-mir-new6 5p (M1-15)	GTCCACAGCATCCAGAACGGG

- *Northernblot*-Sonden auf zelluläre miRNAs (5'-3'):

mmu-mir-15b	TGTAAACCATGATGTGCTGCTA
mmu-mir-16	CGCCAATATTTACGTGCTGCTA
mmu-mir-21	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA
tRNA-Met	TGGTAGCAGAGGATGGTTTCGATCCATCGACCTCTG

4.10 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht speziell erwähnt, von Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK), Biorad (Hercules, USA), Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), Gibco/BRL (Eggenstein, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

4.11 Puffer und Lösungen

LB₀ Medium 1% (w/v) Bacto-Trypton

	0,5% (w/v)	NaCl
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
TE-Puffer	10 mM	Tris-BASE
	0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,4 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,5
1x TAE Puffer	40 mM	Tris-BASE
	1 mM	EDTA
	20 mM	Natriumacetat
1x TBE Puffer	89 mM	Tris-BASE
	89 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
		pH 7,0
DNA Ladepuffer (5x)	15 g	Saccharose
	50 ml	H ₂ O
	0,025%	Xylencyanol
RNA Ladepuffer (1x)	90%	Formamid
	0,025%	Xylencyanol
	0,025%	Bromphenolblau
		in 1x TBE
Zellysepuffer	150 mM	KCl
	25 mM	Tris-BASE (pH 7,5)
	2 mM	EDTA
	1 mM	NaF
	0,5 %	IGEPAL (NP-40)

	0,5 mM	ABESF (frisch)
	0,5 mM	DTT (frisch)
EDC <i>cross-linker</i>	0,13 M	1-Methylimidazol (pH 8,0)
	0,15 M	EDC
50x Denhardt's Lösung	1%	Albumin Fraktion V
	1%	Polyvinylpyrrolidon K30
	1%	Ficoll 400
<i>Northernblot</i> Hybridisierungslösung		
	7,5 ml	20x SSC
	21,0 ml	10% SDS
	0,6 ml	1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2)
	0,6 ml	50x Denhardt's Lösung
	3 mg	Lachssperma DNA
<i>Northernblot</i> Waschlösung I		
	7,5 mL	20x SSC
	1%	SDS
<i>Northernblot</i> Waschlösung II		
	5 %	20x SSC
	1%	SDS
<i>Northernblot</i> Denaturierende Polyacrylamidgele		
	15%/10%	SequaGel Puffer (National Diagnostics, Atlanta, USA)
	60%	SequaGel Concentrate
	30 %	SequaGel Diluent
	0,1%	APS
	0,05%	TEMED
<i>Northernblot</i> SDS Laufpuffer		
	200 mM	Glycin
	25 mM	Tris-BASE
	0,1% (w/v)	SDS

Kristallviolett-Färbelösung

10%	Formaldehyd in PBS
1%	Kristallviolett

Overlay-Medium

10x	BHK-Medium
0,75%	Carboxymethylzellulose
5%	FBS
5%	TPB
1%	Pen/Strep
2 mM	L-Glutamin
33 mM	NaHCO ₃

Argonaut-IP Lyse-Puffer I (1x) - Mikroarray

150 mM	KCl
25 mM	Tris-BASE (pH 7,5)

Argonaut-IP Lyse-Puffer II (2x) - Mikroarray

300 mM	KCl
50 mM	Tris-BASE (pH 7,5)
2 mM	NaF
4 mM	EDTA
1% (v/v)	IGEPAL (NP-40)
1 mM	DTT (frisch)
1 mM	PIC (frisch)

Argonaut-IP Waschpuffer

300 mM	NaCl
50 mM	Tris-BASE (pH 7,5)
5 mM	MgCl ₂
0,01%	IGEPAL (NP-40)

4.12 Kommerzielle Reaktionssätze

GE illustra plasmidPrep mini Spin	GE Healthcare (München, Deutschland)
GE GFX PCR DNA and	
Gel Purification Kit	GE Healthcare (München, Deutschland)

Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miRNeasy Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miRNeasy MiniElute Cleanup Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperScript III	Invitrogen (Carlsbad, USA)
SYBR Green PCR Master Mix	Ambion (Darmstadt, Deutschland)

4.13 Geräte

<i>Real-Time PCR System</i> 7300 (TaqMan)	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Master Cycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Gel Doc 2000	Bio-Rad (München, Deutschland)
Netzgerät Model 200 / 2.0	Bio-Rad (München, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 10	Carl-Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Nanodrop	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
FastPrep-24 Lysator	MP Biomedicals (Illkirch Cedex, Frankreich)
Elektrotransformator	Bio-Rad (München, Deutschland)

4.14 Computerprogramme und bioinformatische Hilfsmittel

Hochdurchsatz-Sequenzierungs	
Analyse Tool	<i>stand-alone</i> Oberfläche; Entwicklung: J. Zhu
SerialCloner v1.3	SerialBasics; F. Perez
RNA-Hybrid v2.1	Universität Bielefeld; M. Rehmsmeier
TargetScan v5.2/v6.0	Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, USA)
miRBase v12-v18	miRBase; S. Griffiths-Jones
UTRdb v2010	Institute for Biomedical Technologies (Bari, Italien)
miRvestigator	<i>stand-alone</i> Web-Oberfläche; Entwicklung: C.L. Plaisier
GeneMANIA	Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research (Toronto, Kanada)
ImageJ	National Institutes of Health, W. Rasband
Affymetrix Expression Console	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
Qlucore	Qlucore (Lund, Schweden)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)
Adobe Creative Suite	Adobe Systems (München, Deutschland)
Microsoft Office	Microsoft (München, Deutschland)

5 Methoden

5.1 Bakteriologische Methoden

5.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Die Bakterien wurden in flüssigem LB₀-Medium entweder ohne, oder mit Antibiotika, über Nacht (üN) bei entsprechender Temperatur (30°C, 37°C) kultiviert. Zum Vereinzeln der Flüssigkulturen auf LB₀-Agar-Platten (\pm Antibiotika) wurden diese ebenfalls über Nacht bei entsprechender Temperatur im Brutschrank inkubiert.

5.1.2 Kryokonservierung von Bakterien (Glyzerinkultur)

Damit die Bakterienkultur bei -80°C gelagert werden kann, wurde eine üN-Flüssigkultur in einem 1:1 Gemisch mit 50%iger Glyzerinlösung verdünnt und aliquotiert.

5.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Bakterien wurden aus 100-300 ml LB₀-Medium gewonnen. Dazu wurde dieses Volumen mit 1-3 ml einer üN-Flüssigkultur angeimpft und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,7$) für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran wurde diese Bakteriensuspension bei 3500 rpm bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml gekühltem ddH₂O und 250 ml gekühltem 0,2 mM Hepes gewaschen und in 10 ml 15% Glyzerinlösung resuspendiert. Diese Lösung wurde erneut bei 3500 rpm (4°C, 20 Minuten) zentrifugiert, in 4-5 ml gekühlter 10% Glyzerinlösung aufgenommen und auf Eis in 100 μ l Aliquots zur Lagerung bei -80°C unterteilt.

5.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien sind die Schritte bis zur Aufnahme des Zellpellets in den Waschlösungen entsprechend des Protokolls aus vorigem Kapitel (5.1.3) durchgeführt worden. Das Pellet wurde in 20 ml gekühltem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen und im Anschluss bei 3500 rpm (4°C, 20 Minuten) zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, erneut zentrifugiert und final in 2 ml 10% Glyzerinlösung aufgenommen. Die 100 μ l Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

5.1.5 Elektrotransformation von Bakterien

Die wie unter Kapitel 5.1.3 hergestellten elektrokompenten Bakterien wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut und im Anschluss mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10-20 μ l dialysiertem Ligationsansatz für eine Minute auf Eis inkubiert. In einer Elektrotransformationskuvette erfolgte die Transformation mit den Einstellungen für *E. coli* (2,5 kV, 200 Ω , 25 μ F). Mit 500 μ l vorgewärmten Medium wurden die Bakterien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 400 rpm auf einem Thermoschüttler für 60 - 90 Minuten bei entsprechender Temperatur (30°C, 37°C) belassen. Verschiedene Volumina wurden auf antibiotikahaltigen LB₀-Platten ausplattiert und üN bei entsprechender Temperatur inkubiert.

5.1.6 Chemische Transformation von Bakterien

Zur Transformation der in Kapitel 5.1.4 beschriebenen Bakterien durch temperaturabhängige Aufnahme von DNA wurden die Bakterien mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 Sekunden. Nach 2 Minuten auf Eis wurde 500 μ l vorgewärmtes Medium zugegeben und bei 400 rpm auf einem Thermoschüttler für 60-90 Minuten bei entsprechender Temperatur (30°C, 37°C) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde wie bereits in Kapitel 5.1.5 beschrieben ausplattiert.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Von einer üN-Flüssigkultur wurde 1 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde gemäß des Protokolls des *illustra plasmidPrep mini Spin Kits* (GE Healthcare) aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde nach Säulenbindung und zwei Waschschritten durch anschließende Elution gewonnen.

5.2.2 Isolation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)

Um größere Mengen an DNA zu gewinnen, wurde die Isolation mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden 100-300 ml einer üN-Flüssigkultur gemäß dem Herstellerprotokoll des Kits aufgearbeitet und final in 200 μ l ddH₂O oder TE-Puffer gelöst.

5.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA Sequenzen vervielfältigt. Die PCR erfolgt in zyklischer Wiederholung von Denaturierung, *annealing* und Amplifikation von DNA durch Synthese des neuen DNA-Strangs in 5'-3' Richtung durch die Polymerase (Elongation). Die Primer für das sequenzspezifische *annealing* sind Abhängig der gewünschten Funktion (Mutation, Deletion oder Klonierung) konstruiert und ggf. anhand bioinformatischer Berechnungen

auf die optimale Hybridisierungstemperatur (X) eingestellt worden. Die Zeit für die zyklische Elongation (Y) ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (ca. 30 Sekunden für 1000 Basen). Das verwendete zyklische Programm mit den Temperaturen für die einzelnen Schritte gliedert sich wie folgt:

1. Initiale Denaturierung: 95°C für 5 Minuten
2. Zyklische Denaturierung: 95°C für 30 Sekunden (30x)
3. Zyklisches *annealing*: X°C für 30 Sekunden (30x)
4. Zyklische Elongation: 72°C für Y Sekunden (30x)
5. Finale Elongation: 72°C für 5 Minuten

Der eingesetzte 20 μ l Probenansatz bestand aus folgenden Bestandteilen: 10 ng - 100 ng DNA; 1 U Taq-Polymerase, 1x Volumen 10x Polymerasen-Puffer, je 0,05 μ M Primer, 1,5 mM $MgCl_2$, je 0,2 mM dNTPs, ad 20 μ l ddH₂O.

5.2.4 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können durch Auftragung auf ein Agarosegel anhand des Laufverhaltens bei Anlegen eines elektrischen Feldes voneinander getrennt werden. DNA-Moleküle weisen in Lösung eine negative Gesamtladung auf, und wandern in der polymerisierten Agarose entsprechend ihrer Größe in Richtung Pluspol. Größere Fragmente bewegen sich langsamer durch das polymerisierte Agarosegel. Für Fragmente mit einer Größe von 0,4 - 6 kb wurden 1 - 1,5% (w/v) Agarosekonzentrationen verwendet. Zur Lösung wurde das entsprechende Volumen an TAE oder TBE Puffer verwendet, und im Anschluss die Agarose durch Erhitzen polymerisiert. Durch die Einlagerung eines DNA-Interkalators (Ethidiumbromid) konnte die DNA unter UV-Licht visualisiert werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid zur flüssigen Agarose erfolgte bei Handtemperatur. Die auf das auspolymerisierte und erkaltete Agarosegel aufzutragende DNA wurde in 1x DNA-Probenpuffer aufgenommen und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrische Spannung zur Auftrennung reichte von 60 bis 120 V. Die Größe konnte durch gleichzeitiges Auftragen eines Längenstandards bestimmt werden.

5.2.5 Isolation von RNA für *Northernblot* auf miRNAs

Die Zellen in der Zellkulturflasche wurden mit 4°C kaltem PBS zweimal gewaschen und durch Zugabe von 1 ml TRI-Reagenz (Roth) lysiert. Bei Suspensionszellen wurden die Zellen nach dem Waschschrift mit PBS zentrifugiert (1300 rpm, 10 Minuten, 4°C) und das Pellet in TRI-Reagenz aufgenommen. Bei adhärenenten Zellen wurde das PBS vollständig entfernt und das TRI-Reagenz direkt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden in beiden Fällen für 3-5 Minuten unter sanftem

Schütteln lysiert und ggf. mit einem Zellschaber zum Pipettieren in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorbereitet. Die Lösung kann bis zur Extraktion bei -20°C eingefroren werden. Nach vollständigem Auftauen muss die Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe durch mindestens 5 minütiges Inkubieren bei RT gewährleistet werden. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (4°C) pro Milliliter TRI-Reagenz wurden durch kräftiges Schütteln für 15 Sekunden die Phasen miteinander vermischt. Durch 15 Minuten Inkubation bei RT, und weiteren 15 Minuten Zentrifugation bei 12000 rpm bei 4°C erfolgte die Phasenseparation. Die wässrige Phase wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100% Ethanol (4°C) vermischt. Einer erneuten Inkubation für 10 Minuten bei RT folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet für maximal 10 Minuten luftgetrocknet. Danach wurde es in 50 µl RNase-freien ddH₂O resuspendiert und nach Erhitzen auf 65°C durch Pipettieren homogenisiert. Die erhaltene RNA kann bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

5.2.6 Isolation von RNA für RT-PCR und Mikroarray

Für die sensitiveren Methoden RT-PCR und Mikroarray führte die Anwendung von kommerziellen Kits zur RNA-Extraktion zu größerer Reproduzierbarkeit der RNA-Qualität. Die Extraktion erfolgte für alle Experimente, außer *Northernblot*, unter Verwendung des *miRNeasy Kits* (Qiagen). Für den Nachweis von miRNAs aus *in vivo* Proben wurde die Aufreinigung und Anreicherung durch das *miRNeasy MiniElute Cleanup Kit* (Qiagen) erreicht. Dazu wurden die Organe nach der Entnahme aus C57BL/6J Mäuse vollständig in *RNAlater* (Roth) aufgenommen und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Vor der RNA-Extraktion wurde das Organ in einem FastPrep-24 Lysator (MP Biomedicals) nach Abtropfen des *RNAlater* Puffers in 1 ml Qiazol homogenisiert. Die Protokolle zur RNA-Extraktion des Herstellers für das *miRNeasy MiniElute Cleanup Kit* wurden nicht verändert.

5.2.7 Erzeugen von cDNA für RT-PCR

Für die Erzeugung von cDNA wurden je nach experimentellen Vorgaben verschiedene Mengen RNA verwendet. Für die Identifizierung und Expressionsanalyse von viralen miRNAs durch *stem-loop* RT-PCR und die Untersuchung der Expression viraler und zellulärer Gene wurden 400 ng RNA eingesetzt.

cDNA für *stem-loop* RT-PCR auf virale miRNAs Die cDNA Erzeugung für den Nachweis von miRNAs erfolgte über die Verwendung von Superscript III Reverse-Transkriptase (Invitrogen) nach folgendem Protokoll. Die 6,75 µl 1x RT-Mix (0,5 µl spezifischer *stem-loop* Primer; 4 µl 5x RT-Puffer; 2 µl 0,1 M DTT; 0,25 µl Superscript III) wurden mit 13,25 µl RNA-Mix (400 ng RNA; 0,5 µl dNTPs; ad 13,25 µl ddH₂O) zusammen durch folgendes *stem-loop* Erststrang-Synthese Programm zu cDNA:

1. Initiale Denaturierung: 65°C für 5 Minuten
2. Zyklische cDNA Erzeugung (60x)
3. 30°C für 30 Sekunden; 42°C für 30 Sekunden; 50°C für 1 Minute
4. Hitzeinaktivierung des Enzyms: 85°C für 5 Minuten

cDNA für SYBR-*green* RT-PCR auf virale Gene Die cDNA Erzeugung zum Nachweis der Expression viraler Gene erfolgte ebenfalls durch Superscript III Reverse-Transkriptase. Zur Umschreibung der mRNA-Transkripte wurden jedoch *random*-Hexamer Primer (rHx) verwendet. Die 6,75 μ l 1X RT-MIX (4 μ l 5X RT-Puffer; 2 μ l 0,1 M DTT; 0,5 μ l rHx Primer; 0,25 μ l Superscript III) wurden mit dem bereits oben erwähnten 13,25 μ l RNA-Mix nach gleichem Protokoll zu cDNA synthetisiert.

5.2.8 Mikroarray-Analysen

Für die Mikroarray-Analysen zur Identifizierung von Unterschieden in der Genexpression wurden die Zellen wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben für 48 Stunden mit MHV-68 WT und Δ 1-9 infiziert. Daraus wurde die RNA wie in Kapitel 5.2.6 angeführt gewonnen, und die Konzentration sowie RNA-Qualität mittels Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt. Im Anschluss wurde die RNA in der Mikroarray-Einrichtung der Technischen Universität München (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene) prozessiert. Dort wurde die RNA für die Durchführung eines *GeneChip Mouse Gene 1.0 ST* (Affymetrix) nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Dazu wurde die RNA mit T7-Oligo(dT)-Primer in cDNA umgewandelt und im Anschluss in Anwesenheit von biotinylierten Ribonukleotidanaloga bei der *in vitro* Transkription markiert. Über die Hybridisierung der so markierten cDNA an die jeweils 25 Basen der genspezifischen Sondensequenz, die sich kovalent auf der Chip-Oberfläche befinden, konnte durch die Verwendung von phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin die Häufigkeit der Transkripte ermittelt werden. Die erhaltenen CEL-Dateien (Affymetrix Datenformat) wurden durch Olivia Prazeres da Costa (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München) bioinformatisch analysiert und mittels der Affymetrix Expression Console für die Auswertungen in Excel Dateien (Microsoft Office) umgewandelt. Aus diesen konnten die Expressionswerte der einzelnen Gene nach der Infektion durch die verschiedenen Viren ins Verhältnis gesetzt werden. Die Signifikanz des Verhältnisses der Expressionswerte wurde durch den einfachen, ungepaarten t-Test aus den Mikroarray-Triplikaten für das jeweilige Virus ermittelt (*p-value*). Die Daten wurden in Abhängigkeit ihres Verhältnisses und der Signifikanz (*p-value* <0,05) sortiert und zur Auswertung verwendet.

Mikroarray-Analyse für RIP-CHIP Proben Die RNA für die RIP-CHIP Proben wurde wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben erzeugt, und gemäß dem Protokoll wie in Kapitel 5.2.6

erläutert gewonnen. Zur Überprüfung der Anreicherung nach der Argonaut-Immunopräzipitation (Verhältnis AGO2/BrdU) wurde eine *stem-loop* RT-PCR auf die zelluläre miRNA mmu-mir-16 für die beiden IP Proben und Total Probe durchgeführt. Der empirische *cut-off* Wert für eine auswertbare Mikorarray-Analyse liegt bei ca. 60x Anreicherung (persönliche Kommunikation L. Dölken). Die Prozessierung für die Durchführung eines *GeneChip Mouse Gene 1.0 ST* folgte dem bereits oben beschriebenen Protokoll.

5.2.9 Expressionsanalysen mittels *Nanostring (n-counter)* Technologie

Eine Expressionsanalyse bei *Nanostring* basiert auf der multiplexen, direkten Zählung der Transkripte [Geiss et al., 2008, Reis et al., 2011]. Über die Verwendung von molekularen, fluoreszenten Barcodes werden die transkript-spezifischen *capture probes* kovalent markiert. Durch Hybridisierung dieser fusionierten Probe an die unbehandelte Transkript-RNA einer Total RNA oder IP Probe kann so die Anzahl ohne enzymatische Zwischenschritte ermittelt werden. Die dazu verwendete RNA wurde wie bereits in Kapitel 5.2.8 (Unterpunkt: Mikroarray-Analyse für RIP-CHIP Proben) beschrieben, gewonnen und an die durchführende Einrichtung versendet (nanoString Technologies, Seattle, USA). Die erhaltenen Rohdaten für die im Duplikat durchgeführten Messungen pro Infektionszustand und Zelllinie (MLE-12 und Ag8/S11) wurden in einer Excel Datei (Microsoft Office) auf die jeweilige Anzahl der Transkripte in der Total Probe normalisiert und vom technischen Hintergrund befreit. Der Hintergrund wurde über die *spiked-in* Kontrollen ermittelt und erlaubte eine interne Qualitätskontrolle für jede Probe (Linearität $R^2 > 0,95$; Sensivität $\approx 0,5$ fM). Die Daten wurden nach der Höhe des Anreicherungsverhältnisses AGO2/BrdU in den infizierten Zellen sortiert. Die Analyse des Anreicherungsverhältnisses der Gene in den nicht-infizierten Zellen führt zu einer Aussage über die Regulation durch zelluläre miRNAs (Anreicherung $\geq 1,2$).

5.2.10 Erzeugen der Bibliothek der sRNAs für die 454-Sequenzierung

Die Klonierung der sRNAs zur Herstellung der Bibliotheken wurde von der Firma Vertis Biotechnology, wie in Tarasov et al. [2007] beschrieben, durchgeführt. Die sRNAs wurden aus den Zellen unter Verwendung des *mirVana miRNA Isolations-Kit* (Applied Biosystems) extrahiert und auf einem 12,5% denaturierendem Polyacrylamid-Gel (PAGE) mit *SYBR-green II* gefärbt. Nach passiver Elution der RNAs der Längen 15-30 bp wurden sie durch Ethanol gefällt und in RNase-freien ddH₂O gelöst. Die RNAs wurden durch Poly(A)-Polymerase adenyliert und ein Adapter wurde an das 5'-Phosphat der miRNA ligiert (siehe 5'-Adapter). Über die vier markierten Platzhalter (N) wird ein Probenspezifischer *barcode* eingeführt. Die Erststrangsynthese der cDNA wurde über die Moloney-*murine leukemia virus* RNaseH Reverse-Transkriptase mit dem 3'-oligo(dT) Primer durchgeführt (siehe 3'-oligo(dT) Primer). Die erhaltene cDNA wurde in 22 Zyklen mit der Phusion Polymerase (*high-fidelity*, Finnzymes) amplifiziert. Die cDNA-*pools* aus den verschiedenen Proben (NIH-; NIH+; S11-; S11+) wurden in gleichem Verhältnis gemischt

und die Amplifikationsprodukte mit einer Länge von 120-135 bp durch 6% PAA Gelelektrophorese fraktioniert. Nach Isolation durch das *Nucleospin Extract II Kit* (Macherey Nagel) wurden die cDNA-pools in 5 mM Tris-HCl (pH 8,5) in einer Konzentration von 10 ng/l aufgenommen und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch 454 *Life Sciences* (Branford, USA) mit einem Genom-Sequencer 20. Die Daten wurden an *Gene Expression Omnibus* (GEO) übermittelt und stehen unter der *Accession* Nummer *GSE22938* zur Verfügung.

5'-Adapter: 5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAGCTNNNNGACCTTGGCTGTCACTCA -3'
3'-oligo(dT) Primer: 5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGACATCGCCCCGC(T)25-3'

NIH- (nicht-infizierte NIH3T3 Zellen): *barcode* ACTA

NIH+ (WT MHV-68 infizierte NIH3T3 Zellen): *barcode* AGGT

S11- (unbehandelte S11 Zellen): *barcode* ATCG

S11+ (TPA induzierte S11 Zellen): *barcode* CAAT

5.2.11 Northernblot auf virale miRNAs

Die RNA für die Durchführung eines *Northernblot* (NB) wurde wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben aus den Zellen extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Nanodrops (Thermo Scientific) bestimmt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten NB wurden Gesamt-RNA Mengen von 30 - 50 μg pro Sonde verwendet. Die RNA wurde im Verhältnis 1:1 mit 2x Bromphenolblau Ladepuffer auf ein 15% PAGE Gel geladen und im Laufpuffer (1x TBE) bei 28 Watt für eine Stunde aufgetrennt. Durch eine Ethidiumbromid-Färbung (EtBr) konnte unter UV-Licht die Ladekontrolle überprüft werden. Dazu wurden 10 μl 1% EtBr-Lösung in 100 ml 1x TBE auf das Gel für 10 Minuten gegeben. Die Aufnahme der Kontrolle erfolgte im BioDoc-Analyser. Das Auswaschen der EtBr-Lösung erfolgte durch zweimaliges waschen in je 100 ml ddH₂O. Das *Blotten* auf die Membran basierte auf dem *semi-dry* Prinzip. Dabei wurden vorgefeuchtete *Whatman*-Papiere verwendet. Der Aufbau gliederte sich wie folgt: zwei *Whatman*-Papiere dienen als Grundlage, dann folgt die Blot-Membran, das Gel und erneut zwei *Whatman*-Papiere. In einer Blot-Apparatur wurde für 30 Minuten eine Spannung von 20 V angelegt. Die geblottete Membran wurde luftgetrocknet und dann quervernetzt (*crosslinked*). Dazu wurde das EDC-Protokoll zum *enhanced crosslinking* nach Pall et al. [2007] verwendet. Die Sonden-Oligonukleotide (siehe Kapitel 4.9) wurden in einer Stock-Konzentration von 20 μM eingesetzt. Jeweils 1 μl Sonde wurde mit 2 μl 10x Polynukleotidkinase (PNK) Puffer 1, 1 μl PNK und 1 μl γP^{32} -ATP auf 20 μl ddH₂O eingestellt, und für eine Stunde bei 37°C radioaktiv markiert. Die Reinigung der Sonde erfolgte über eine G-Sephadex Säule mit anschließender Inaktivierung der *Labeling*-Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA für 10 Minuten bei 75°C. Die Membranen wurden eine Stunde bei 50°C in der NB-Hybridisierungslösung prä-hybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurde der Blot über Nacht bei 50°C unter Rotation inkubiert. Anschließend

wurde die Membran zweimal mit Waschlösung I und einmal mit Waschlösung II für jeweils 10 Minuten bei 50°C gewaschen. Der Blot wurde dann in Saranfolie in der Dunkelkammer in einer Amplifikationskassette auf einen Film gegeben. Die Entwicklung des Films erfolgte bei Raumtemperatur (RT) nach 2-5 Tagen Inkubation bei -80°C.

5.2.12 *Realtime*-PCR auf virale miRNAs (*stem-loop* RT-PCR)

Aus der in Kapitel 5.2.7 hergestellten cDNA zur miRNA-Detektion wurden 1:5 Verdünnungen hergestellt und jeweils 5 µl zu 20 µl RT-PCR *Master-Mix* (1 µl *forward*-Primer, 1 µl Universal *reverse*-Primer, 12,5 µl SYBR-*green*, 5,5 µl ddH₂O) gegeben. Dieser Ansatz wurde bei folgenden Bedingungen der RT-PCR unterzogen:

1. Initiale Denaturierung: 95°C für 10 Minuten
2. Initiale Amplifikation: 50°C für 30 Sekunden / 60°C für 30 Sekunden
3. Zyklische Amplifikation: (45 Zyklen)
4. 55°C für 30 Sekunden; 68°C für 34 Sekunden; 95°C für 15 Sekunden
5. Dissoziationsschritt/Schmelzpunktanalyse: Temperaturgradient von 50°C-95°C (1°C/min)

Bei der *stem-loop* RT-PCR nach Chen et al. [2005] wird über sechs endständige Nukleotide komplementär zu der zu detektierenden miRNA ein *stem-loop* Primer angefügt, der eine *taqman*-Sonde Bindesequenz (*Universal Probe Library* (Roche) UPL #21; GTCTCGGT) und die Sequenz für einen universellen *reverse*-Primer besitzt (siehe Kapitel 4.9). Der *Master-Mix* für den *taqman*-Ansatz (20 µl + 5 µl 1:5 Verdünnungen des Templats) bestand aus folgenden Komponenten: 1 µl *forward*-Primer, 1 µl *reverse*-Primer, 1 µl UPL21, 12,5 µl TaqMan-Master (2x) und 4,5 µl ddH₂O.

Die erhaltenen Ct-Werte wurden durch Subtraktion der Ct-Werte der internen Kontrolle (rRNA 5.8S) normalisiert und damit als ΔCt bezeichnet. Durch das Einsetzen der ΔCt -Werte in die Formel $2^{-\Delta Ct}$ war eine graphische Darstellung möglich. Auf Grund der hohen Sensitivität der Methode können bei höherer Zyklenzahl oder sogar bei Abwesenheit der Transkripte unspezifische Amplifikate entstehen. Dieser technische Hintergrund wurde durch Verwendung von minus-RT-, Wasser- oder nicht-infizierten Templat-Kontrollen bestimmt und entsprechend berücksichtigt.

5.2.13 RT-PCR auf virale und zelluläre Gene

Die cDNA zur Analyse der viralen Genexpression (siehe Kapitel 5.2.7) wurde ebenfalls 1:5 verdünnt und nach bereits in Kapitel 5.2.12 beschriebenem Verhältnis zu dem SYBR-*green* *Master-Mix* hinzugefügt. Das RT-PCR Programm auf virale Gene entsprach dem vom Hersteller empfohlenen *two-step* Protokoll (Applied Biosystems).

Die erhaltenen Ct-Werte wurden ebenfalls durch Subtraktion der Ct-Werte der internen Kontrollen (zelluläres Transkript L8 oder 18S, virales Transkript ORF50) normalisiert. Die resultierenden Δ Ct-Werte wurden in die in Kapitel 5.2.12 eingeführte Formel eingesetzt und graphisch dargestellt.

5.3 Zellkultur

5.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in den jeweiligen Zellkulturmedien bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Eine Passagierung erfolgte wachstumsabhängig in den Verhältnissen 1:5, 1:10, 1:15 und 1:30. Adhärenzte Zellen wurden mit Trypsin-EDTA bei 37°C abgelöst, während Suspensionszellen durch Zentrifugation (1300 rpm, 10 Minuten, 4°C) pelletiert wurden. Beide wurden in frischem Medium resuspendiert, um im gewünschten Verhältnis in eine neue Zellkulturflasche/-schale überführt zu werden. Sämtliche Arbeitsschritte zur Kultivierung fanden unter der Sterilbank statt. Darüber hinaus waren alle Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien steril. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch eine Neubauer-Zählkammer. Durch ein Deckgläschen wird ein definierter Raum mit dem Volumen von 10 μ l geschaffen, in den die Zellsuspension eingebracht wurde. Die Zellzahl innerhalb dieses Raums wurde unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde eine Trypanblau-Färbung im Verhältniss 1:5 bei der Zählung in der Neubauer-Zählkammer verwendet. Die toten Zellen sind wegen einer zerstörten Zellmembran für den Farbstoff permeabel und daher gefärbt.

5.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen einer frühen Passage können zur Lagerung kryokonserviert werden. Aus einer konfluenten 75 cm² Zellkulturflasche wurden vier Aliquots gewonnen. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben (Kapitel 5.3.1) kultiviert, und das Pellet bei der Passagierung in 10 ml PBS als Waschschrift resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurde es in 10% (v/v) DMSO in FCS resuspendiert und in die entsprechenden Kryogefäße abgefüllt. Die Lagerung ist bei -80°C bis zu 100 Tage möglich, in flüssigem Stickstoff unbegrenzt. Zum Auftauen wurde ein Aliquot schnellstmöglichst auf Raumtemperatur gebracht, um es in 10 ml Medium überführen zu können. Nach Zentrifugation (1300 rpm, 4°C, 5 Minuten) wurde das Pellet in vorgewärmtem Medium aufgenommen und kultiviert.

5.3.3 Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren

Der Transfer von DNA in eukaryotische Zellen wird unter Anwendung des Transfektionsreagenz FuGENE HD (Roche) erreicht. Die zu transfizierenden Zellen wurden in entsprechender Dichte

so ausgesät, dass sie nach 24 h 60-70%ige Konfluenz aufwiesen. 3 μ l Transfektionsreagenz wurden mit 1-3 μ g in 100 μ l Medium ohne FCS für 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Kolloidbildung inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Lösung auf die Zellen, welche bis zum Erntezeitpunkt auf den Zellen verblieb.

5.3.4 Luciferase-Assay

Zur Etablierung des Assays wurde eine bereits aus der Literatur bekannte miRNA:mRNA-Interaktion als Beispiel verwendet. Die Sequenzen (3'-UTR oder CDS) der ausgewählten Zielgene einer miRNA wurden in ein Luciferase Plasmid (psiCHECK-2) kloniert (Bereitstellung freundlicherweise durch F. Grässer). Durch Mutationen in der miRNA-Bindestelle wurden Kontrollen für die Spezifität der miRNA-Regulation erstellt. Über Kotransfektion mit einem miRNA-exprimierenden Plasmid (pSG5) durch FuGENE HD (Roche) nach Hersteller-Protokoll wurde in HEK293 Zellen die Regulation durch Lichtemission und deren Inhibition bei miRNA-Bindung sichtbar. Dazu wurden in einer 24-well Platte 5x10⁴ Zellen ausgelegt und am nächsten Tag mit je 2 μ g Plasmid-DNA transfiziert. Die Assay-Analyse nach dem *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) erfolgte nach Angaben des Herstellers 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit der Plasmid-DNA (schematische Darstellung siehe Abbildung 12).

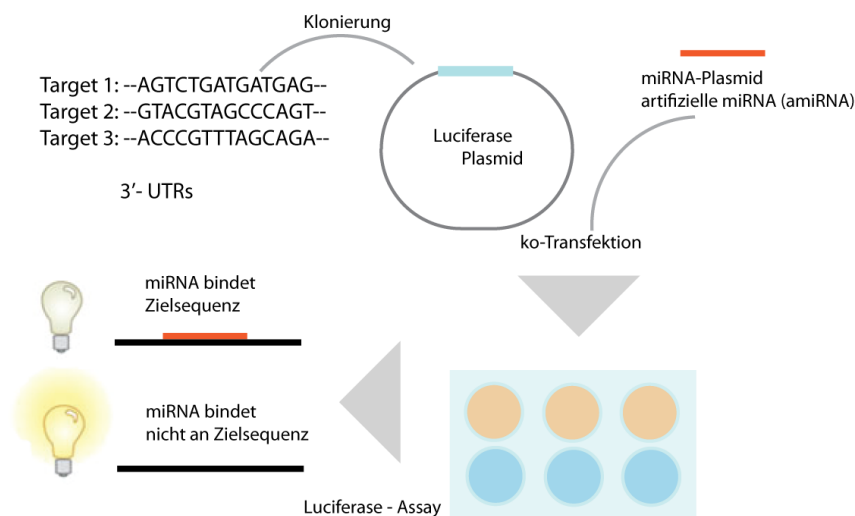


Abbildung 12: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung eines Luciferase-Assays.

5.4 Virologische Methoden

5.4.1 Infektion von Zellen mit MHV-68

Für die Infektion von Zellen wurden diese am Vortag in definierter Anzahl ausgelegt. Am Tag der Infektion wurde das Nährmedium abgenommen und durch ein geringeres Volumen an Infektionsmedium ersetzt und für 1 - 1,5 Stunden auf den Zellen belassen. Das Infektionsmedium wurde in entsprechender Multiplizität der Infektion (MOI, Menge an Virus pro zu infizierender

Zelle) mit Virus versetzt. Nach dem Infektionszeitraum wurde das Infektionsmedium abgenommen und durch normales Nährmedium ersetzt. Die so infizierten Zellen wurden entsprechend den Zeitvorgaben der Experimente bei den in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert, und im Anschluss gemäß den Vorgaben der nachfolgenden Experimente behandelt (DNA/RNA-Extraktion, Wachstumskurve, etc.).

5.4.2 Präparation eines Virusstocks

Zur Produktion eines Virusstocks wurden BHK-21 Zellen in vier 75 cm² Zellkultur-Flaschen (ZK-Flasche) ausgesät. Die Infektion erfolgte wie bereits oben beschrieben (Kapitel 5.4.1), jedoch bis zum vollständigen CPE (Cytopathischer Effekt, Ablösen von adhären Zellen von der ZK-Flaschen Oberfläche). Die abgelösten Zellen wurden bei 1300 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und in 4 ml Nährmedium aufgenommen. Durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen aufgeschlossen und die intrazellulären Virionen freigesetzt, und mittels Zentrifugation bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4°C die Zellbestandteile von den Virionen im Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde in 500 µl Aliquots verteilt und bei -80°C eingefroren. Diese Aliquots dienen zur Herstellung der Arbeitsstocks zu jeweils 50 µl, die erneut eingefroren werden, um vor der ersten experimentellen Anwendung titriert zu werden (siehe Kapitel 5.4.3).

5.4.3 Titerbestimmung von MHV-68 durch Plaqueassay

Zur Titerbestimmung wurden BHK-21 Zellen verwendet, die am Vortag der Infektion in einer 24-*well*-Platte in definierter Anzahl ausgelegt wurden. Aus den zu titrierenden Proben wurden Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:10 hergestellt (bspw. 10⁻¹ - 10⁻⁸). Die Infektion der BHK-21 Zellen erfolgte durch Abnehmen des Nährmediums, Zugabe des Infektionsmediums aus den Verdünnungsreihen (900 µl) für 1,5 Stunden bei 37°C und anschließender Entfernung des Infektionsmediums sowie Zugabe des vorgewärmten Overlay-Mediums, wie nach Watanabe et al. [1982] beschrieben. Die Inkubation wurde nach 5 Tagen durch Abnahme des Overlay-Mediums und Färbung des adhären Zellrasens mit 0,1% Kristallviolett-Färbelösung beendet. Die Färbelösung verblieb für 10 Minuten auf den Zellen und konnte danach mit Wasser abgespült werden. Nach dem Trocknen der gefärbten Zellen konnten die Plaques pro *well* je nach Verdünnungsstufe mittels des Mikroskops ausgezählt werden. Die Formel zur Titerbestimmung lautete wie folgt:

$$\text{PFU/ml} = 1,1 \cdot \text{Dilution} \cdot \# \text{ Plaques}$$

Die Titer eines Virusstocks werden in PFU/ml angegeben (*plaque forming units*). Die Kalkulation dieser ergibt sich aus der Multiplikation eines Volumenangleichfaktors auf Grund der eingesetzten 900 µl (1,1), der Verdünnungsstufe und der Anzahl (#) der Plaques pro *well*.

5.4.4 Isolierung von Virionen-DNA

Die wie bereits beschrieben infizierten Zellen (Kapitel 5.4.1) wurden bis zum CPE inkubiert und durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Die Extraktion der Virionen-DNA erfolgte durch Zentrifugieren der Zellbestandteile bei 2500 rpm bei 4°C in einem 50 ml Falcon. Der Überstand mit den Virionen wurde in ein Sorvall SS34 Röhrchen überführt und 1 Stunde bei 20000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, Rotor SS34). Der Überstand wurde verworfen und das Virionenpellet in 500 μ l Tris/EDTA (100 mM Tris-BASE pH 8,0; 20 mM EDTA) resuspendiert. Nach dem Transfer in 2 ml Reaktionsgefäße erfolgte die Zugabe von 500 μ l 1% SDS mit anschließendem sanften Mischen. Durch Zugabe von Proteinkinase K (Endkonzentration: 500 μ g/ml) und Inkubation von 1-3 Stunden bei 56°C wurden die DNA-assoziierten Proteine entfernt. Im Anschluss wurde das gleiche Volumen (1x) an Phenol/Chloroform (P/C) zugegeben und für 10 Minuten unter Rotation bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Phenol/Chloroform (siehe oben) behandelt. Nach zweimaliger P/C-Extraktion wurde der Überstand mit 100% Ethanol (500 μ l EtOH, 20 μ l 3 M Natriumacetat) gefällt. Durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C wurde die DNA pelletiert und konnte durch Zugabe von 70% EtOH und erneute Zentrifugation gewaschen werden. Das resultierende Pellet wurde luftgetrocknet, final in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

5.4.5 Wachstumskurven mit MHV-68 *in vitro*

Die Eigenschaften bzw. das Wachstumsverhalten eines Virus während der lytischen Replikation sind für das Wildtyp Virus charakteristisch. Untersuchungen dieser Aspekte bei genetisch veränderten Viren (z.B. miRNA *knock-out* Mutante Δ 1-9) ermöglichen Aussagen zur Funktion und Bedeutung der veränderten Genomregion während der lytischen Replikation. Dazu wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinien (MLE-12, NIH3T3 und Ag8) in 6-*well*-Platten ausgelegt. Die Infektion der Zellen erfolgte wie bereits in Kapitel 5.4.1 beschrieben. Die Zeitpunkte der Analyse wurden je nach Fragestellung gewählt und in der vorliegenden Arbeit auf 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden post-Infektion (hpi, *hours post-infection*) festgelegt. Der Zeitpunkt Null dient als Kontrolle für die Menge an eingesetztem Virus. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Platten bei -80°C eingefroren. Die Platten wurden zur weiteren Prozessierung zweimalig aufgetaut und eingefroren. Die Zellsuspensionen wurden bei 1300 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, und die Überstände gemäß dem in Kapitel 5.4.3 angeführten Protokoll titriert.

5.4.6 Bestimmung der Plaquegröße

Plaques bilden sich durch die Infektion von Nachbarzellen über Zell-zu-Zell Transfer von Virionen. Um in genetisch veränderten Viren Unterschiede zu Wildtyp Viren in dieser Verbreitungsweise festzustellen, wird die Plaquegröße ermittelt. Dazu wurde in einer 6-*well*-Platte eine

vorher festgelegte Anzahl an Zellen am Vortag der Infektion ausgelegt (NIH3T3, $1,0 \times 10^5$ Zellen pro *well*). Die Infektion mit den Viren Wildtyp MHV-68 und $\Delta 1-9$ mit einer MOI von 0,01 erfolgte wie bereits in Kapitel 5.4.1 beschrieben. Nach 50 - 72 hpi bildeten sich gut sichtbare Plaques, welche durch Kristallviolett-Färbung fixiert wurden. Die Plaques wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera mit Hilfe des Mikroskops fotografiert und anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* vermessen. Die Berechnung der Fläche eines Plaques wurde in frei gewählten Flächeneinheiten angegeben (aSU, *arbitrary square units*).

5.5 Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Argonaut Immunopräzipitation

Für die AGO-Immunopräzipitation (AGO-IP) wurden ca. 1×10^9 Zellen verwendet (10x Ø 15 cm Zellkultur-Platten). Die Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und in 1 ml Argonaut-IP Lysepuffer I pro Platte aufgenommen oder resuspendiert. Die tatsächliche Lyse erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens Argonaut-IP Lysepuffer II (2x) und gründlicher Homogenisation. Die Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei 14000 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein entsprechend größeres Gefäß (15 ml oder 50 ml Falcon) überführt und kann bei -80°C gelagert werden. Zur Immunopräzipitation wurden Protein G-Sepharose *beads* mit Antikörper inkubiert. Dazu wurden pro 5 ml Lysat 30 μl *beads* in 1 ml RPMI (ohne FCS) resuspendiert. Von den Antikörpern zur spezifischen IP (α -AGO2) oder unspezifischen Kontroll-IP (α -BrdU) wurden je 4 μg in 1 ml RPMI (ohne FCS) aufgenommen und mit den *beads* über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad jeweils in einer *Handy-Spin* Säule (5 ml, Thermo Scientific) inkubiert. Vor Zugabe der Lysate zu den *beads* wurden die Säulen 2x mit 5 ml PBS (4°C) durch Auslaufen gewaschen. Das Lysat wurde in drei Fraktionen aufgeteilt: 50% AGO-IP; 50% BrdU-IP und 100 μl für eine Total-RNA Probe (siehe Abbildung 13). Die Total-RNA Probe wurde unmittelbar nach Abnahme mit 600 μl Qiazol für die RNA-Extraktion durch das *miRNeasy Kit* (Qiagen) vorbereitet (siehe Kapitel 5.2.6). Die beiden Immunopräzipitationen wurden für 4 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad mit den antikörper-beladenen *beads* inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine kurze Impulszentrifugation bei max. 1000 rpm für 3-5 Sekunden. Die *beads* wurden durch Zugabe von jeweils 5 ml Argonaut-IP Waschpuffer (4°C) zweimal gewaschen, dann für 10 Minuten in 5 ml Waschpuffer bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und erneut kurz zentrifugiert. Ein weiterer zweimaliger Waschschrift mit Argonaut-IP Waschpuffer (4°C) wurde gefolgt von einmal 5 ml PBS (4°C). Die restliche Flüssigkeit wurde durch Auslaufen und einer kurzen Impulszentrifugation entfernt. Die *beads* wurden unmittelbar danach in 400 μl Qiazol für 5 Minuten aufgenommen. Beim Auslaufen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde mit 300 μl Qiazol nachgespült und der Rest durch Schließen der *Handy-Spin* Säule ausgepresst. Die RNA in Qiazol kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

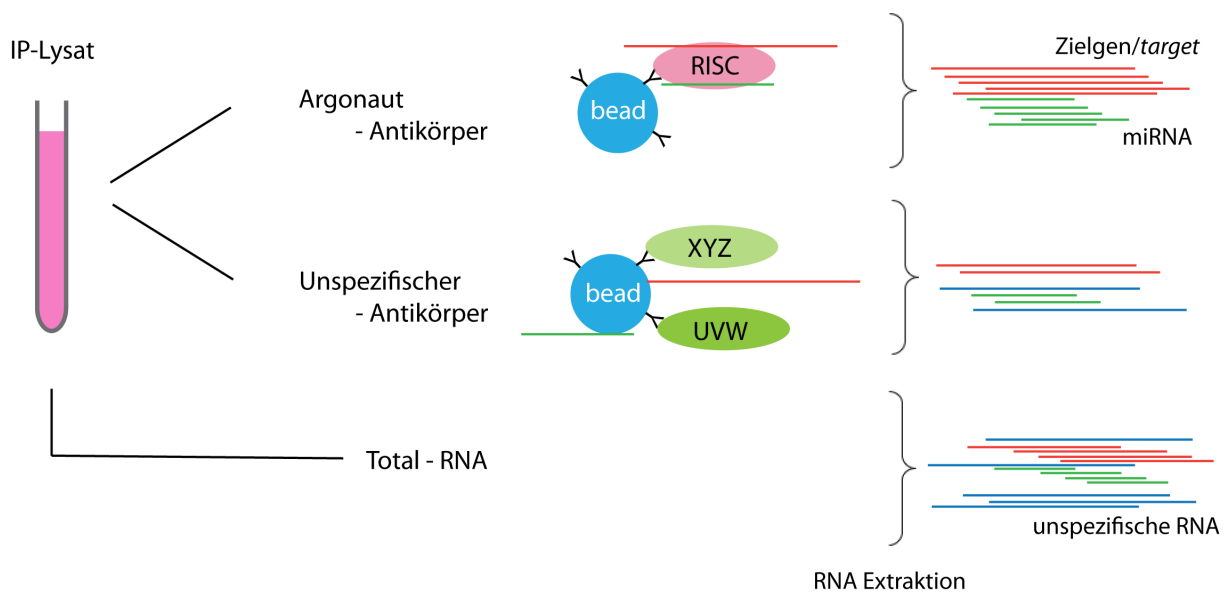


Abbildung 13: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs einer RISC-Immunopräzipitation durch einen Argonaut-Antikörper (z.B. α -AGO2), einen unspezifischen Antikörper (z.B. α -BrdU) und einer Total-RNA Probe. Die resultierenden Fraktionen beinhalten nach der RNA-Extraktion von den *beads* die angereicherten Zielgene bzw. *targets* (AGO2), unspezifische RNA (BrdU) oder die gesamte RNA der jeweiligen Lysate. Zielgene/*targets* sind in rot, miRNAs in grün und unspezifische RNA in blau hervorgehoben. Zeichenerklärung: IP (Immunopräzipitation); RISC (*RNA induced silencing complex*); XYZ, UVW (unspezifische Proteine)

5.6 Bioinformatische Methoden

5.6.1 Analyse der 454-Sequenzierung

Die Analyse der 454 sequenzierten Bibliotheken erfolgte durch das von J. Zhu entwickelte *stand-alone* Software Tool (unter Verwendung von: RealBasic Program, www.realsoftware.com). Die Eckpunkte der Analyse sind nachfolgend kurz zusammengefasst. Eine zuerst notwendige qualitative Normalisierung der Chromatogramme der Sequenzierung erfolgte durch die veröffentlichte Phred Software [Ewing and Green, 1998, Ewing et al., 1998]. Die Poly(A)-Sequenzabschnitte sowie Adapter-Sequenzen (siehe Kapitel 5.2.10) wurden entfernt. Alle Sequenzen mit einer Länge über 15 nt wurden zur Annotation gegenüber miRBase [Griffiths-Jones, 2004, Griffiths-Jones et al., 2006], tRNA Datenbank [Chan and Lowe, 2009], ncRNA Datenbank [Szymański et al., 2003] und dem MHV-68 Genom (RefSeq *NC_001826.2*) verwendet. Die nicht-annotierbaren Sequenzen wurden auf die Präsenz neuer miRNA Kandidaten untersucht. Dafür wurden zusätzlich zur Sequenz 100 nt der rechten und linken Flanke der jeweiligen Genomlokalisierung durch den Sekundärstruktur Algorithmus mFOLD nach Zuker [2003] analysiert. Lediglich Sequenzen, die eine Haarnadelstruktur ausbildeten, wurden als Kandidat näher betrachtet. Die Häufigkeit bzw. Abundanz wurde über den Anteil der einzelnen miRNA an der gesamten *read*-Anzahl ermittelt. Die *heatmap* zur Darstellung der Expressionsprofile wurde durch die Mayday-Plattform nach

Battke et al. [2010] erzeugt.

Kurze Einführung in die Technologie der Hochdurchsatz-Sequenzierung Die automatisierte Sanger-Sequenzierung wird als die *erste Generation* der Hochdurchsatz-Sequenzierung bezeichnet und basiert auf der Verwendung von di-deoxy-Nukleotiden (ddNTP) der vier Basen im Gemisch mit den deoxy-Nukleotiden (dNTP) in vier PCR-Ansätzen [Metzker, 2005]. Durch dieses dNTP/ddNTP-Gemisch stoppt die Polymerase-Reaktion bei Einbau eines ddNTP, und es entstehen Fragmente mit unterschiedlicher Länge, welche über Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Sequenz wird von dem resultierenden Gel abgelesen.

Die „nächste Generation“ (NGS, *next generation sequencing*) hat diese zeitaufwendige und kostspielige Methode teilweise ersetzt. Die aktuellen NGS Technologien, wie 454 (Roche) und Solexa (Illumina) führen schneller zu mehr Daten und sind deutlich kostengünstiger. Dies ist bei 454 durch die kontinuierliche Amplifikation der jeweiligen Sequenz über die sogenannte Pyro-Sequenzier Methode möglich und basiert nicht auf ddNTPs, sondern auf der Abspaltung von PPi (Pyrophosphat) bei der Polymerase-Reaktion der PCR mit dem jeweiligen dNTP und der enzymatischen Umsetzung des PPi durch Luciferase (siehe Abbildung 14 A) [Medini et al., 2008].

Solexa war die erste kommerziell verfügbare NGS-Plattform und baut auf die vierfarbige *cyclic reversible termination* (CRT) [Metzker, 2010]. Bei ihr werden bei der Polymerase-Reaktion zyklisch fluoreszenzmarkierte Nukleotide inkorporiert, über ultra-hoch auflösende Laser die 3'-kovalent angefügte, spezifische Fluoreszenz angeregt und im Anschluss der Messung wieder abgetrennt. Dadurch wird die 3'-Phosphatgruppe für das nächste Nukleotid im Zyklus zugänglich (siehe Abbildung 14 B) [Metzker, 2010].

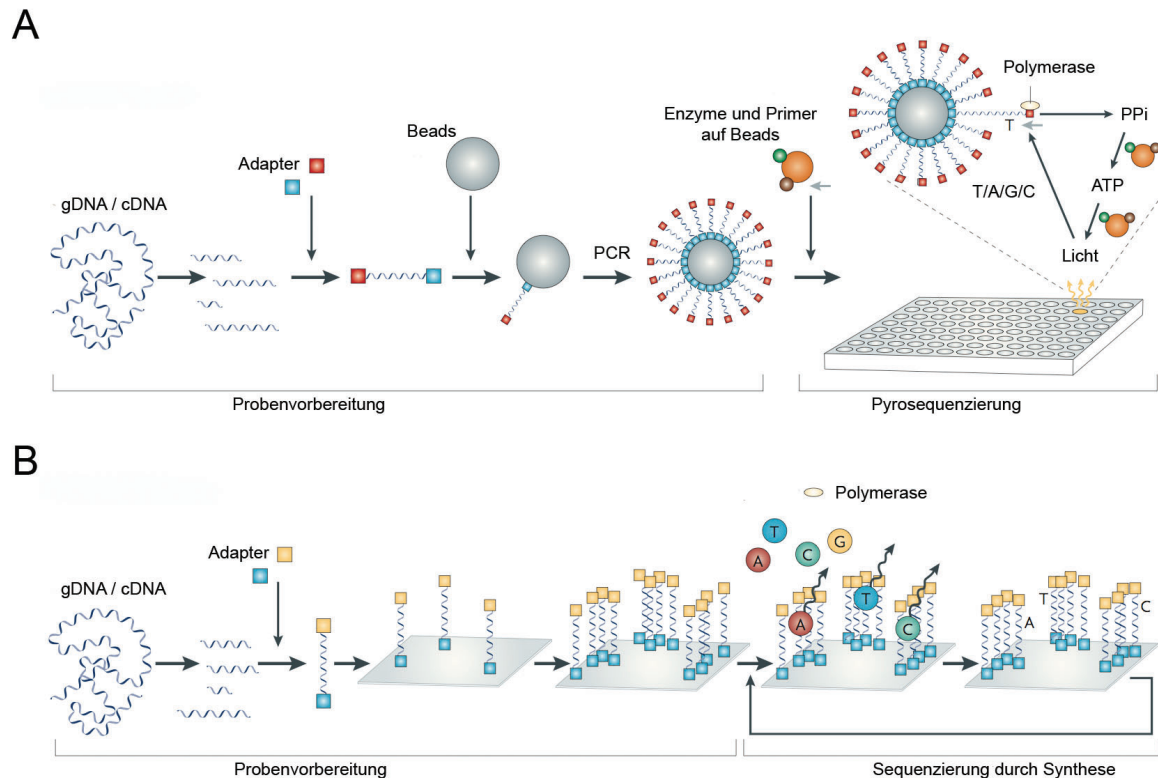


Abbildung 14: Schematische Darstellung der verschiedenen Prinzipien der *next generation sequencing* Methoden. A) Bei der 454-Pyro-Sequenzierung (Roche) wird die DNA über Adapter-Sequenzen in einer Wasser/Öl Emulsion vereinzelt und an *beads* gekoppelt. Nach Amplifikation der einzelnen Sequenzen durch PCR und Vereinzelung der *beads* auf einer PicoTiter Platte (PTP) findet die Sequenzierungsreaktion unter Zugabe von *beads* mit Luziferase in Einzelschritten mit jeweils einem Nukleotid (dNTP, T/A/G/C) statt. Durch das von den dNTPs abgespaltene PPi (Pyrophosphat) findet bei Einbau eine Lichtemission über die Luciferase-Reaktion statt. B) Das Prinzip von Solexa (Illumina) basiert auf der Ankopplung einer DNA-Sequenz über Adapter an eine Oberfläche. Die Sequenzen werden ebenfalls über eine PCR amplifiziert, die Sequenzierung beruht aber auf der CRT (*cyclic reversible termination*). Dabei werden die Basen durch spezifische Fluoreszenz-Farbstoffe an der 3'-Phosphatgruppe markiert. Bei Einbau des Nukleotids kann durch Anregung über einen Laser die Farbe eindeutig der jeweiligen Base zugeordnet werden. Die Fluoreszenz-Markierung wird danach abgetrennt und ermöglicht den nächsten Polymeraseschritt im Reaktionsgefäß mit allen vier Nukleotiden gleichzeitig. Entnommen aus Medini et al. [2008].

5.6.2 Vorhersage der miRNA *targets* durch TargetScan

Über das Webtool TargetScan (www.targetscan.org) können *targets* für miRNAs vorhergesagt werden. Die Vorhersage für miRNAs der Wirte Mensch, Maus, Wurm und Fliege erfolgt durch Eingabe des Namens der miRNA. In der Version 5.2 (Juni 2011) kann über *TargetScan Custom* eine eigene *seed*-Sequenz eingegeben werden. Damit sind auch Vorhersagen für virale und miRNAs anderer Organismen möglich. Mit TargetScan wurden die 3'-UTRs der eingetragenen Gene (18615 Gene / 23795 Transkripte in TargetScanMouse) nach konservierten 8mer und 7mer Bindestellen für die *seed*-Sequenz der viralen miRNAs durchsucht (siehe Abbildung 10). Das Ergebnis einer Vorhersage ist eine Liste mit den Namen der Gene und den zugeordneten

Bindestellen für eine miRNA.

5.6.3 Analyse der funktionellen Homologe durch *miRvestigator Framework*

Mit dem *miRvestigator Framework* (<http://mirvestigator.systemsbiology.net/>) von Plaisier et al. [2011] können Gene, denen eine Regulation durch ein distinktes *set* an miRNAs zugeschrieben ist, auf eine gemeinsame Sequenz hin untersucht werden. Durch Eingabe der Gensymbole in die Web-Oberfläche wurden die 3'-UTRs verschiedener Zielgene miteinander verglichen und auf eine oder mehrere konservierte Sequenzbereiche analysiert. Über die Komplementarität dieser Bereiche zu *seed*-Sequenzen von viralen oder zellulären miRNAs konnten funktionale Homologe ermittelt werden.

Teil III

Ergebnisse

6 Hochdurchsatz-Sequenzierung von MHV-68 infizierten Zelllinien

Die neun von Pfeffer et al. [2005] identifizierten viralen miRNAs in MHV-68 sind durch Klonierung der Fraktion der sRNAs gefunden worden. Durch Anwendung von *deep-sequencing* sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob über die bereits bekannten miRNAs hinaus noch weitere miRNAs in MHV-68 kodiert sind. Dazu wurde die persistente mit MHV-68 infizierte murine B-Zelllinie S11 entweder unbehandelt (Probe S11-) oder nach TPA-Behandlung (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) zur Induktion des lytischen Zyklus (Probe S11+) verwendet. Für die Untersuchung der *de novo* lytischen Replikation wurden nicht-infizierte (Probe NIH3T3-) und infizierte murine Fibroblasten NIH3T3 (Probe NIH3T3+) verwendet. Damit sollte die Expression von viralen und zellulären miRNAs nach Infektion und während des Lebenszyklus des Virus analysiert werden.

6.1 Fraktionierung der sRNAs und Sequenzierung

Aus den Gesamtlysaten der Proben wurde die RNA extrahiert und über gelelektrophoretische Auftrennung nur die Fraktion der sRNAs der 454-Sequenzierung zugeführt. Nach dem Sortieren der Barcodes wurden 59 922 *reads* für die NIH3T3- Probe, 54 135 für NIH3T3+, 43 035 für S11- und 60 704 für S11+ erhalten (GEO-Nummer: *GSE22938*). Durch Anwendung der von J. Zhu entwickelten Software wurden die Adapter-Sequenzen entfernt. Die Auswertung ergab, dass 99% der so erhaltenen Sequenzen größer als 15 nt sind (siehe Tabelle 3). Die Mehrheit der gefundenen Sequenzen sind miRNAs, und nur ein geringer Anteil wird durch nicht-kodierende RNAs (ncRNA) gebildet. Dies ist ein Hinweis auf die Güte der erstellten Bibliotheken, da der Anteil potentiell spontan degradierter RNA sehr gering war. In den Zellen S11 konnten fast 10% der Sequenzen MHV-68 zugeordnet werden, während in den infizierten NIH3T3 lediglich 0,5% gefunden wurden (siehe Abbildung 15).

	NIH3T3-	NIH3T3+	S11-	S11+
Total <i>reads</i> >15 nt	59922 59360	54135 53920	43035 42699	60704 59773
MHV-68 Sequenzen	0	276	4129	5575
MHV-68 bekannte miRNA	0	194	3237	4425
MHV-68 neue <i>star</i>	0	55	370	536
MHV-68 neue miRNA	0	23	496	576
MHV-68 miRNA <i>loop</i>	0	1	3	2
andere MHV-68 Sequenzen	0	3	23	36
mmu Sequenzen	53555	49407	33575	45657
mmu bekannte miRNA	49879	46888	29977	38896
mmu neue <i>star</i>	190	123	78	141
mmu miRNA <i>loop</i>	39	12	39	59
mmu rRNA	1007	345	1324	3176
mmu tRNA	1860	1706	1540	2110
mmu ncRNA	580	333	617	1275

Tabelle 3: Verteilung der Sequenzen innerhalb der sRNA-Bibliotheken der MHV-68 infizierten Zelllinien nach 454-Sequenzierung und Auswertung durch die Software von J. Zhu (2010).

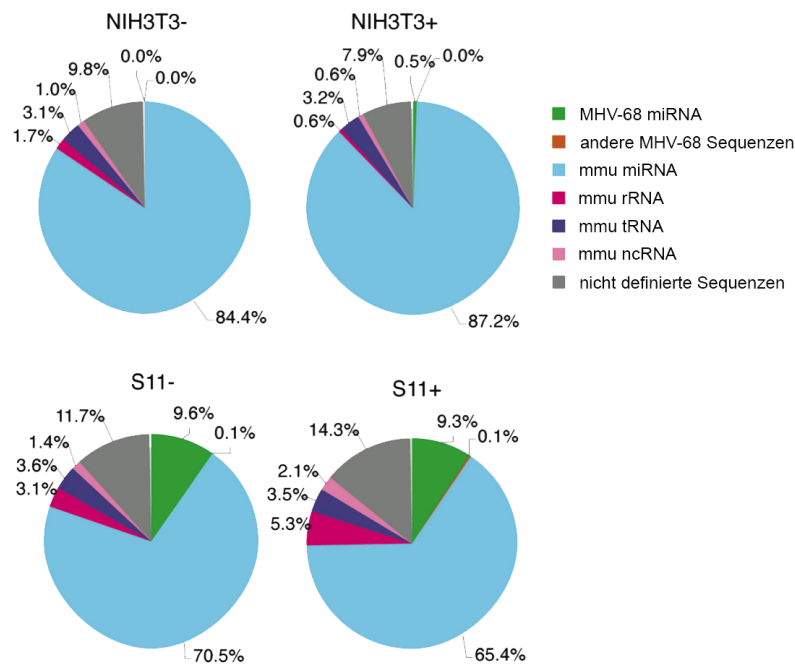


Abbildung 15: Analyse der sRNA-Bibliotheken der Zelllinien NIH3T3 und S11 nach 454-Sequenzierung. Dargestellt sind die Verhältnisse der Häufigkeiten der jeweiligen Sequenzspezies aus Tabelle 3 in Prozent. Die Mehrheit der erhaltenen *reads* sind murine miRNA Sequenzen (hellblau).

6.2 Identifizierung von neuen miRNAs in MHV-68

Ein Abgleich der MHV-68 zugehörigen Sequenzen aus den sRNA-Bibliotheken zur miRNA Datenbank miRBase (*Release 14*) brachte eine größere Zahl von bislang nicht kategorisierten Sequenzen hervor. Von diesen waren ungefähr 50% den bereits bekannten miRNA Haarnadel-*loops* zuzuordnen und wurden daher als neue miRNA* (*star*) Sequenzen annotiert. Die restlichen miRNA Sequenzen wurden durch den Strukturvorhersage Algorithmus mFOLD auf die Ausbildung der miRNA-spezifischen Haarnadel-Struktur untersucht. Sechs neue MHV-68 miRNA-Gene konnten identifiziert werden. Die Bezeichnung dieser wurde in Analogie zu den bereits bekannten miRNAs in chronologischer Reihenfolge von mghv-mir-M1-10 bis mghv-mir-M1-15 gewählt. Aus ihnen geht eine Gesamtzahl von 15 maturen miRNAs hervor (siehe Tabelle 4). Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl der *reads* beider Stränge von mghv-mir-M1-11 könnte diese eventuell als miRNA-Kandidat vernachlässigt werden. Durch die perfekte Ausbildung der Haarnadel-Struktur (siehe Abbildung 16) ist jedoch anzunehmen, dass eine mature miRNA aus dieser Sequenz entsteht. Die anderen fünf Vorläuferstrukturen (*precursor*) zeigen die gewöhnliche, imperfekte miRNA-Faltung und weisen eine Tendenz zur Bildung der maturen miRNA vom 3'-Strang auf.

Neue miRNA Kandidaten ^a	Stem-loop Struktur der mutmaßlichen miRNA-Vorläufer ^b	ΔG (kcal/mol) ^b	Genomkoordinaten ^c
mghv-mir-M1-10*	UU C A C GUCUG	-21.5	262-282
mghv-mir-M1-10	AAGAACC UC GUG AAUCACUU C	-21.5	301-322
	UUCUUGG AG CAC UUAGUGAG A		
	UU A G A GUUU		
mghv-mir-M1-11-5P	AG	-44.9	762-780
mghv-mir-M1-11-3P	GACAGCUGUCAGGGUUACAUGAG A	-44.9	792-811
	CUGUCGACAGUCCCCAAUGUACUU A		
	C		
mghv-mir-M1-12*	GUAA U AAAUUAAU	-21.5	1722-1744
mghv-mir-M1-12	GGGU---ACUCUCA CACCAAUGU A	-21.5	1764-1788
	CCCA UGAGGGU-GUGGUUUCA U		
	UUUUC UCC AACGAUG		
mghv-mir-M1-13*	U UGU C- UA	-19.6	3749-3770
mghv-mir-M1-13	GGGAAGAG-UC UGAG-UGGC GCG G	-19.6	3787-3808
	UUCUUCUC AG ACUC AUCC UGU G		
	U G UGU U AA U		
mghv-mir-M1-14*	GCCC G G CUGA	-28.7	5105-5126
mghv-mir-M1-14	CGUUCUG AUGCUGUGG ACA A	-28.7	5140-5161
	GCAAGAC UGCGACAUC UGU A		
	UUUU G G CGUU		
mghv-mir-M1-15	CU -C-- CC- U U	-15.7	5462-5486
	AG ACCCG GUGG GGAG GU U		
	UC UGGGC CACC UCUC CA A		
	UC CUUC CAA C G		

Abbildung 16: a) Die Bezeichnungen der neuen miRNA-Sequenzen entsprechen den für die Übermittlung an die miRNA-Datenbank miRBase gewählten Namen (www.mirbase.org). Die Definition von miRNA und miRNA* ist abhängig von der Abundanz des jeweiligen Stranges (siehe Tabelle 4). b) Die RNA Sekundärstruktur und die korrespondierende freie Energie ΔG sind durch mFOLD (v3.2) ermittelt worden. Die tatsächliche Größe der *stem-loop*-Struktur ist nicht experimentell bestätigt worden. c) Die Genomkoordinaten der neuen miRNAs von MHV-68 beziehen sich auf das Genom unter der RefSeq Nummer *NC_001826.2*.

Name ^a	Sequenz	Anzahl der reads		
		NIH3T3+	S11-	S11+
mghv-mir-M1-1	UAGAAAUGGCCGUACUCCUUU	35	1168	1572
mghv-mir-M1-1*	AGGAAGUGGGUCCAACUU	0	2	0
mghv-mir-M1-2	CAGACCCCCUCUCCCCUCUUU	1	36	71
mghv-mir-M1-2 5p	AGAGGGGAGUGUGUGGUCUGU ^b	19	149	225
mghv-mir-M1-3	GAGGUGAGCAGGAGUUGCGCUU	7	29	42
mghv-mir-M1-3*	AGCGAACCUUCUCUCACUGCCC	0	9	15
mghv-mir-M1-4	UCGAGGAGCACGUGUUAUUCUA	0	23	29
mghv-mir-M1-4*	AGAUAGCAUGUGCCGUCCUCUUU	0	6	7
mghv-mir-M1-5	AGAGUUGAGAUCGGGUCGUCUC	8	144	275
mghv-mir-M1-5*	AGGCAAACCCGAGCUCCUCCUU	29	28	84
mghv-mir-M1-6	UGAAACUGUGUGAGGUGGUUUU	1	38	101
mghv-mir-M1-6*	CAACCACCUCCCACAAUUUCAG ^b	0	22	28
mghv-mir-M1-7 5p	AAAGGUGGAGGUGCGGUAACCU	11	140	231
mghv-mir-M1-7 3p	GAUAUCGCGCCCACCUUUUUU	12	306	510
mghv-mir-M1-8	AGCACUCACUGGGGGUUUGGUC	61	679	977
mghv-mir-M1-8*	UGACCAACCCUAAGUGAGUUUU	7	154	177
mghv-mir-M1-9	UCACAUUUGCCUGGACCUUUUU	58	674	617
mghv-mir-M1-10	UGAUUACACGGAAGGUUCUUUU	5	62	90
mghv-mir-M1-10*	UUAAGAACCCUCAGUGCAAUC ^b	1	20	12
mghv-mir-M1-11 5p	AGCUGUCAGGGGUUACAUG ^b	0	0	1
mghv-mir-M1-11 3p	UGUAACCCUGACAGCUGUC	0	1	0
mghv-mir-M1-12	UUUGGUGUGGGAGUCCUACCCUUU	4	76	103
mghv-mir-M1-12*	AAGGGUACUCUCAUCACCAAUGU ^b	0	1	2
mghv-mir-M1-13	UAUCUCAUGUGAGCUCUUCUUU	8	254	276
mghv-mir-M1-13*	UGGGAAGAGUCUGUUGAGUGGC	0	1	4
mghv-mir-M1-14	UGCUCACAGCGUGCAGAACGUUU	2	74	78
mghv-mir-M1-14*	CCCGUUCUGGAUGCUGUGGGAC ^b	3	7	8
mghv-mir-M1-15	AGCUACCCGCGUGGCCGGAGUGUUU	0	0	2

Tabelle 4: Die *read*-Anzahl der bekannten und neuen miRNA-Sequenzen. a) Schwarz markierte Bezeichnungen sind die von Pfeffer et al. [2005] identifizierten; in rot sind die noch nicht annotierten miRNA*-Sequenzen angegeben; in blau sind die neuen miRNA/miRNA*-Sequenzen von bislang unbekannten Vorläuferstrukturen hervorgehoben. b) Auf Grund der Charakteristika der 454-Sequenzierung muss die miRNA-Sequenz ggf. um ein zusätzliches „A“ ergänzt werden.

6.3 Sequenzhomologien der neuen miRNAs von MHV-68 zu anderen miRNAs

Unter Verwendung von Programmen zum Sequenz-*Alignment* konnten *seed*-Sequenz Homologien der bekannten und neuen miRNAs von MHV-68 zu anderen Herpesviren oder zellulären miRNAs gefunden werden. Da KSHV oder MDV (Marek's Disease Virus, siehe Tabelle 2, Seite 22) funktionelle Orthologe für die onkogene, zelluläre miRNA mir-155 kodieren, stellte sich die Frage, ob MHV-68 ebenfalls Orthologe besitzt [Skalsky et al., 2007, Zhao et al., 2009]. Der einzige Treffer für Homologien zu zellulären miRNAs war die *seed*-Sequenz von mghv-mir-M1-4 zu mmu-mir-151 5p, welche in Zusammenhang mit

Tumorinvasion und Metastasierung gebracht wird [Ding et al., 2010]. Interessanterweise waren zwei Homologien bei den bereits oben benannten Viren, den unmittelbaren genetischen Verwandten KSHV und MDV zu finden. Die miRNA mghv-mir-M1-9 teilt die *seed*-Sequenz mit kshv-mir-K12-3, während die neu identifizierte mghv-mir-M1-14 homolog zu mdv1-mir-M31 ist (siehe Abbildung 17).

<p>UCGAGGAGCACGUGUUAUUCUA UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU</p>	<p>mghv-mir-M1-4 mmu-mir-151 5p</p>
<hr/>	
<p>UCACAUUUGCCUGGACCUUUUU UCACAUUCUGAGGACGGCAGCGA</p>	<p>mghv-mir-M1-9 kshv-mir-K12-3</p>
<hr/>	
<p>UGCUACAGCGUGCAGAACGUUU UGCUACAGUCGUGAGCAGAUCAA</p>	<p>mghv-mir-M1-14 mdv1-mir-M31</p>

Abbildung 17: Dargestellt sind die *seed*-Sequenz Homologien zwischen miRNAs von MHV-68 und *M. musculus* sowie anderen Herpesviren (KSHV und MDV) anhand des *Alignments* der Sequenzen der maturen miRNA (5'-3').

6.4 Lokalisation der neuen miRNAs im Genom von MHV-68

Wie auch die bereits bekannten miRNAs von MHV-68 fanden sich die sechs Gene der neuen miRNAs innerhalb der ersten 6 kbp am linken Genomende. Sie sind ebenfalls in enger Assoziation mit den vtRNAs und entstehen dadurch unter den gleichen Expressions- und Prozessierungsumständen wie die bereits bekannten miRNAs (siehe Abbildung 18 A). Der konservierte A/B-Promotor führt zur Ausbildung der vtRNA-miRNA-miRNA Primärtranskripte von ungefähr 200 nt Länge unter Transkription durch RNA-Polymerase III, welche durch ein Oligo(dT)-Signal in der DNA gestoppt wird (siehe Abbildung 18 B - I). Die miRNA mghv-mir-M1-11 liegt hinter einem Oligo(dT)-Signal, weist jedoch *downstream* eine weitere Transkriptionsterminations-Sequenz auf. Von den vtRNAs für mghv-mir-M1-4 und mghv-mir-M1-14 ist auf Grund mangelnder *reads* oder ungenügender Faltung in mFOLD lediglich ein miRNA-Arm nachweisbar (siehe Abbildung 18 D und H).

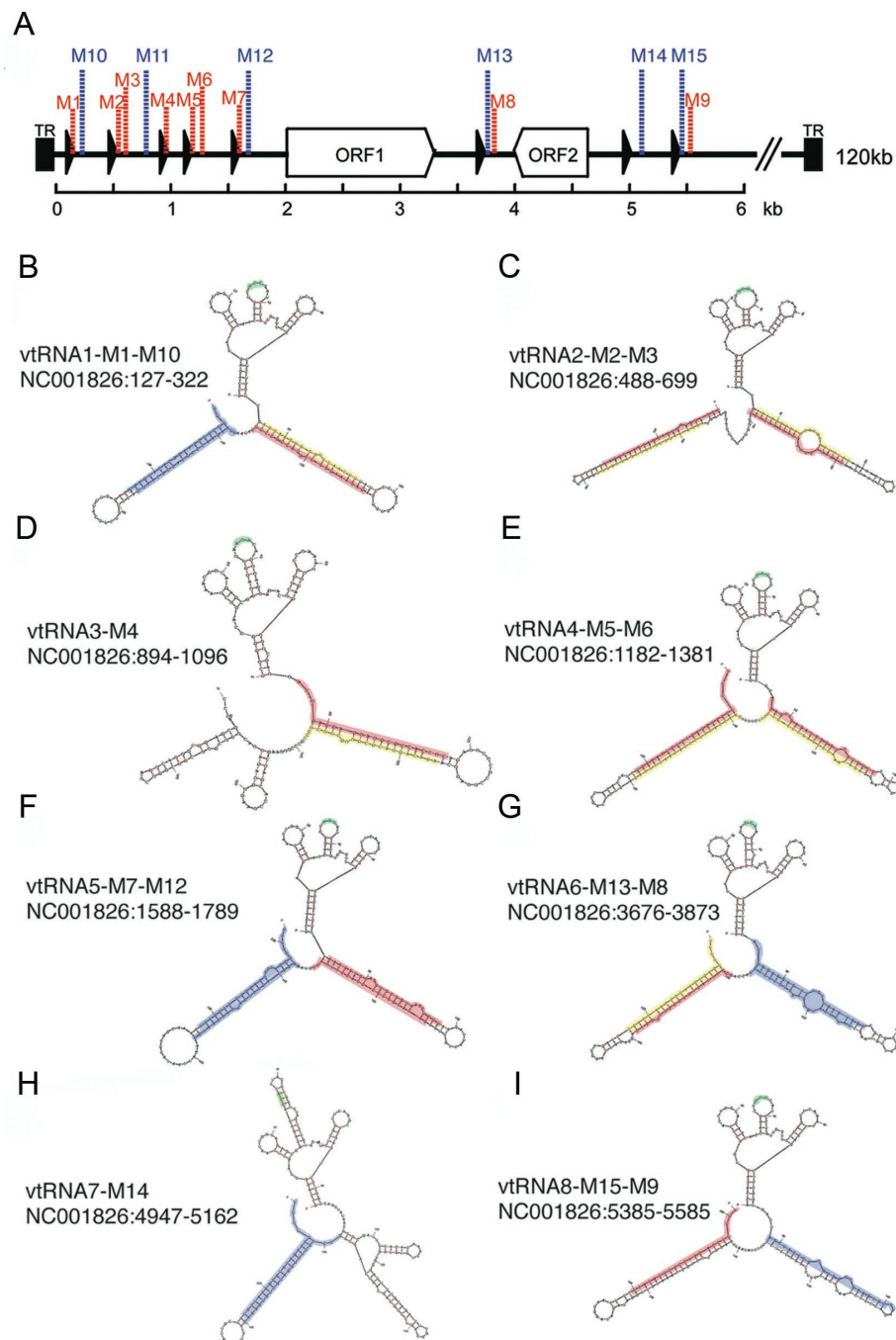


Abbildung 18: Genomlokalisierung der miRNAs von MHV-68 und die Faltung der Primärtranskripte. A) Die Lokalisierung der miRNAs im Genom von MHV-68 wurde modifiziert übernommen von Pfeffer et al. [2005]. Die acht viralen tRNAs (schwarze Dreiecke) befinden sich innerhalb der ersten 6 kb des 120 kb Genoms. Die bereits bekannten miRNAs M1 - M9 sind in rot dargestellt. Die in dieser Arbeit identifizierten neuen miRNAs M10 - M15 in blau. B-I) Die Primärtranskripte der Struktur vtRNA-miRNA-miRNA und ihre Faltung berechnet durch mFOLD. Die grün markierten Sequenzbereiche entsprechen den Anticodons der vtRNA-Sequenz, beschrieben durch Bowden et al. [1997]. Die bereits bekannten miRNAs sind in rot dargestellt, während in gelb die neuen miRNA*-Sequenzen hervorgehoben sind. In blau sind die neu identifizierten miRNAs präsentiert. Die Genomkoordinaten sind hinter der Identifizierungsnummer des MHV-68 Genoms der RefSeq Nummer *NC_001826.2* angegeben.

6.5 Validierung der Expression der neuen miRNAs von MHV-68

Zur Validierung von Kandidaten für ein miRNA-Gen wurde die Goldstandard Methode *Northernblot* für RNA aus S11 Zellen angewendet. Um gleichzeitig eine Aussage zur Funktionalität der neuen miRNAs von MHV-68 zu erhalten, wurde eine Immunopräzipitation des RISC durchgeführt. Dazu wurde die RNA als Fraktion des spezifischen AGO2(6F4) Antikörpers, des unspezifischen Antikörpers gegen BrdU oder als gesamtes Zelllysate eingesetzt.

Die *Northernblot*-Sonden gegen mghv-mir-M1-10, mghv-mir-M1-12 und mghv-mir-M1-14 konnten in der Totalfraktion und in der AGO2 Fraktion miRNAs aufzeigen (siehe Abbildung 19 A). Dies lässt darauf schließen, dass die neuen, wie auch die bereits publizierten miRNAs von MHV-68, funktionell in den RISC integriert sind. Trotz der im Vergleich hohen Abundanz von mghv-mir-M1-13 (siehe Tabelle 4) konnte die *Northernblot*-Sonde nur ein schwaches Signal erzeugen (Daten nicht gezeigt). Durch die jedoch weitaus sensitivere Methode der *stem-loop* RT-PCR konnte die Expression in S11 und in mit MHV-68 Wildtyp infizierten Ag8 Zellen 48 Stunden nach der Infektion (hpi) nachgewiesen werden. Die zelluläre miRNA mmu-mir-191 diente als Kontrolle und konnte in allen drei Proben detektiert werden, während sie in uninfizierten Ag8 Zellen die einzig detektierbare war (siehe Abbildung 19 B).

Da die Prozessierung der miRNAs von MHV-68 über RNA-Polymerase III funktioniert, und damit von einer Prozessierung durch tRNaseZ anstatt Drosha abhängt [Bogerd et al., 2010], sollte die weitere Prozessierung von MHV-68 miRNAs näher untersucht werden. Dazu wurden zwei unabhängig voneinander erzeugte Wildtyp und Dicer -/- MEF-Klonpaare mit MHV-68 infiziert, und die RNA durch einen *Northernblot* analysiert. Die Dicer *knock-out* Zellen waren nicht in der Lage, zelluläre wie auch virale miRNAs zu produzieren (siehe Abbildung 19 C). Somit werden die miRNAs von MHV-68 *downstream* von tRNaseZ entsprechend der normalen miRNA-Prozessierung Dicer-abhängig gebildet.

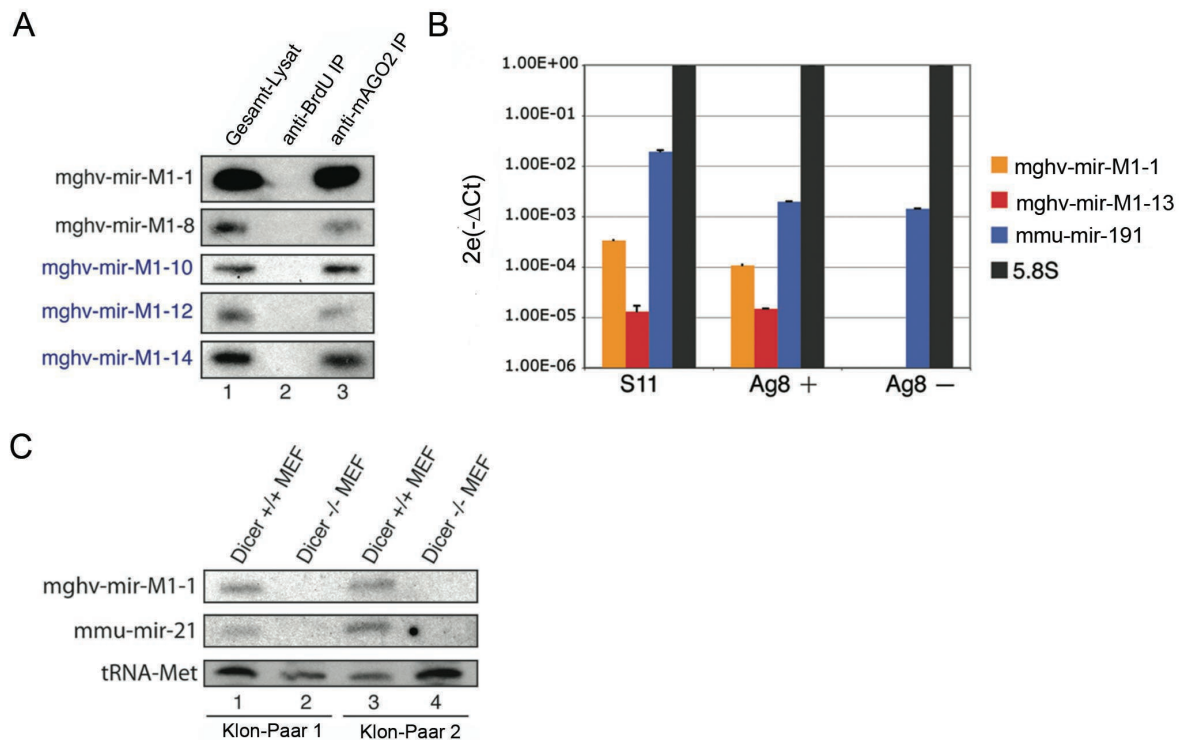


Abbildung 19: Validierung der neuen miRNAs von MHV-68. A) Durch *Northernblot* wurden die neuen miRNAs von MHV-68 nachgewiesen. Die Total-RNA wurde aus S11 Zelllysaten isoliert (*Lane 1*), mit unspezifischem α -BrdU Antikörper (*Lane 2*) oder spezifischem AGO2(6F4) Antikörper (*Lane 3*) einer Immunpräzipitation unterzogen, und auf eine Nylonmembran geblottet. Sonden gegen die bekannten und neuen miRNAs von MHV-68 wurden radioaktiv markiert und zur Detektion verwendet. Die neuen miRNAs von MHV-68 sind in blau hervorgehoben. B) Durch *stem-loop* RT-PCR konnte die neue miRNA mghv-mir-M1-13 validiert werden. Dazu wurde RNA aus S11 sowie infizierten (Ag8+) und nicht-infizierten Ag8 Zellen (Ag8-) gewonnen. Die Proben wurden mittels einer *stem-loop* RT-PCR analysiert. Die zelluläre miRNA mmu-mir-191 diente dabei als Positivkontrolle, während auf die rRNA 5.8S normalisiert wurde. Die Darstellung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. C) Ein *Northernblot* auf virale und zelluläre miRNAs in Dicer -/- MEFs zeigt die Dicer-abhängige Prozessierung der viralen miRNAs. Von zwei unabhängig voneinander hergestellten Klonpaaren (Dicer +/+ MEF; Dicer -/- MEF) wurde nach Infektion mit Wildtyp MHV-68 die RNA isoliert und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion von mmu-mir-21 und mghv-mir-M1-1 zeigte, dass nur in Anwesenheit von Dicer die miRNAs prozessiert werden. tRNA-Met diente hierbei als Ladekontrolle.

6.6 Zelluläres miRNA Profil in MHV-68 infizierten Zelllinien

Die meisten *reads* der Bibliotheken sind murine miRNAs (siehe Tabelle 3). Durch den Abgleich mit der Annotation bei miRBase (v14.0) konnten 61 neue murine miRNA*-Sequenzen identifiziert und bei miRBase registriert werden (siehe Tabelle 5).

Name ^a	Sequenz	Anzahl der reads			
		NIH3T3-	NIH3T3+	S11-	S11+
mmu-let-7a-2*	CUGUACAGCCUCCUAGCUUUC	1	1	1	0
mmu-let-7e*	CUAUACGGCCUCCUAGCUUUC	7	15	0	0
mmu-let-7f-2*	CUAUACAGUCUACUGUCUUUC	6	2	5	5
mmu-mir-100*	ACAAGCUUGUGUCUAAUAGGUAU	1	1	0	0
mmu-mir-103-1*	GGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUG	0	5	0	0
mmu-mir-103-2*	AGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUG	16	7	3	6
mmu-mir-107*	AGCUUCUUUACAGUGUUGCCUUG	2	2	0	1
mmu-mir-132*	AACCGUGGCUUUCGAUUGUUAC	0	0	1	1
mmu-mir-134*	CUGUGGGCCACCUAGUCACC ^b	2	5	0	0
mmu-mir-143*	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGG	7	2	0	0
mmu-mir-152*	UAGGUUCUGUGAUACACUCCGACU	1	0	0	0
mmu-mir-155*	CUCCUACCUGUUAGCAUUAAC ^b	0	0	3	6
mmu-mir-16-2*	ACCAUAUUAUUGUGCUGCUUU ^b	27	24	16	24
mmu-mir-181b-1*	CUCACUGAACAAUGAAUGC ^b	2	0	0	0
mmu-mir-181c*	ACCAUCGACCGUUGAGUGGACC	5	1	0	0
mmu-mir-182*	GUGGUUCUAGACUUGCCAACU ^b	0	2	0	0
mmu-mir-190*	ACUAUAUAUCAAGCAUUAUCCU ^b	1	0	0	0
mmu-mir-1948*	AUAUGAGUAUUCUGCCUAAAU	1	0	0	1
mmu-mir-195*	CCAAUAUUGGUGUGCUGCUCC ^b	0	1	0	0
mmu-mir-196a-1*	CAACGACAUCAAACCACCUGAU	0	2	0	0
mmu-mir-196b*	UCGACAGCACGACACUGCCUUC ^b	1	0	0	0
mmu-mir-1981*	CAUCUAACCCUGGCCUUUGAC ^b	1	2	0	0
mmu-mir-19b-1*	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	2	1	0	0
mmu-mir-210*	AGCCACUGCCCACCGCACACUG	7	1	0	0
mmu-mir-217*	CAUCAGUUCUAAUGCAUUGCCU	0	1	0	0
mmu-mir-221*	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUUCUGU	8	6	0	0
mmu-mir-222*	UCAGUAGCCAGUGUAGAUCU	1	1	0	0
mmu-mir-23a*	GGGUUCCUGGGGAUGGGAUUU	0	0	3	0
mmu-mir-25*	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUGC	0	2	0	0
mmu-mir-26a-2*	CCUGUUCUUGAUUACUUGUUUC	1	1	0	0
mmu-mir-29b-2*	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAGAUU	0	0	1	0
mmu-mir-301a*	GCUCUGACUUUAUUGCACUACU	1	0	0	0
mmu-mir-30d*	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC	7	2	0	1
mmu-mir-32*	CAAUUUAGUGUGUGUGAUUU	2	0	0	1
mmu-mir-329*	AGAGGUUUUCUGGGUCUCUGUU	0	1	0	0
mmu-mir-34a*	AAUCAGCAAGUAUACUGCCCU ^b	11	2	22	33
Fortführung auf nächster Seite ...					

... Fortführung von letzter Seite					
Name ^a	Sequenz	Anzahl der reads			
		NIH3T3-	NIH3T3+	S11-	S11+
mmu-mir-350*	AAAGUGCAUGCGCUUUGGG ^b	2	0	0	0
mmu-mir-351*	GGUCAAGAGGCGCCUGGGAAC	2	6	0	0
mmu-mir-361*	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUUUGU	1	2	2	2
mmu-mir-370*	CAGGUCACGUCUCUGCAGUU ^b	0	2	0	0
mmu-mir-379*	UAUGUAACAUGGUCCACUAACU	2	1	0	0
mmu-mir-410*	AGGUUGUCUGUGAUGAGUUCG	1	0	0	0
mmu-mir-466h-3p	UACGCACGCACACACACAC ^b	1	2	0	0
mmu-mir-466i-5p	UGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG	0	0	2	3
mmu-mir-466l-5p	UUGUGUGUACAUGUACAUGUAU ^b	1	0	0	0
mmu-mir-493*	UUGUACAUGGUAGGCUUUC ^b	1	0	0	0
mmu-mir-497*	CAAACCACACUGUGGUGUUAG ^b	1	0	0	0
mmu-mir-500*	AAUCCUUGCUAUCUGGGUGCUUAGU	0	0	0	1
mmu-mir-543*	AAGUUGCCCCGCGUGUUUUUCG	1	0	0	0
mmu-mir-652*	CAACCCUAGGAGGGGGUGCCAUUC ^b	3	0	2	0
mmu-mir-664*	CUGGCUGGGGAAAAUGACUGG ^b	1	4	0	0
mmu-mir-669a-1*	ACAUACAUAACACACACACGUAU ^b	22	6	0	0
mmu-mir-669d*	UAUACAUAACACACCAUAUAC ^b	1	0	0	0
mmu-mir-669f-5p	AGUUGUGUGUGCAUGUGCAUGUGU	7	1	0	0
mmu-mir-670*	UUUCCUCAUAUCCAUCAGGAGUGU	0	3	0	0
mmu-mir-677*	GAAGCCAGAUGCCGUUCCUGAGAAGG	0	0	0	2
mmu-mir-700*	UAAGGCUCCUCCUGUGCUUGC ^b	2	1	0	0
mmu-mir-805*	AUUUAUAUGUCUUUCAAGUUCUAG	0	1	0	0
mmu-mir-92a-1*	AGGUUGGGAUUUGUCGCAAUUCU	1	1	0	0
mmu-mir-96*	CAAUCAUGUGUAGUGCCAAUAU	1	0	0	0
mmu-mir-98*	CUAUACAACUACUACUUUCCU	9	1	0	0

Tabelle 5: Zelluläre miRNAs von S11 (S11-) und S11, in denen der lytische Zyklus durch TPA-Induktion reaktiviert wurde (S11+) sowie von nicht-infizierten (NIH3T3-) und mit MHV-68 Wildtyp infizierten NIH3T3 (NIH3T3+).

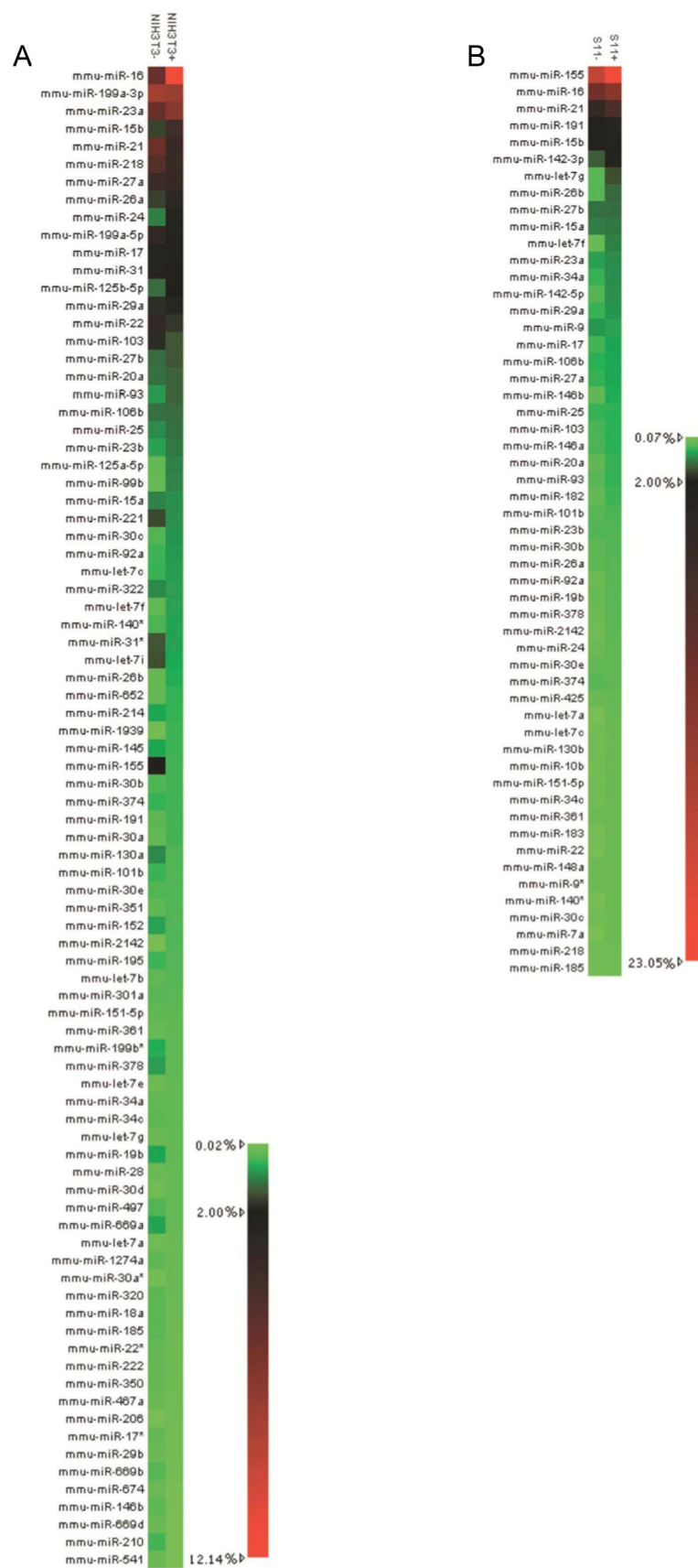


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Änderung der zellulären miRNAs zwischen den Bibliotheken der Zelllinien durch Analyse der Hochdurchsatz-Sequenzierung. A) Die Veränderung der zellulären miRNAs nach Infektion während der lytischen Replikation in NIH3T3. Die größten Änderungen der Expression weisen dabei die zellulären miRNAs mmu-mir-16, mmu-mir-199a 3p, mmu-mir-23a, mmu-mir-15b und mmu-mir-21 auf. B) Die Veränderungen der Expression der zellulären miRNAs in der persistent infizierten murinen B-Zelllinie S11 nach Induktion des lytischen Zyklus durch TPA. Neben den bereits bei NIH3T3 unter A) erwähnten miRNAs ist die zelluläre miRNA mit den größten Unterschieden mmu-mir-155.

Auf Grund der Verwendung von nicht-infizierten und infizierten NIH3T3 konnten die Veränderungen der Expression von zellulären miRNAs nach Infektion mit MHV-68 verfolgt werden (siehe Abbildung 20 A). Im Vergleich zu den in S11 detektierten zellulären miRNAs wies die Fibroblastenzelllinie nach Infektion ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster der zellulären miRNAs auf (S11- vs. NIH3T3+). Ebenfalls fanden sich nach Induktion der Reaktivierung durch TPA in den persistent infizierten S11 Zellen im Vergleich zur *de novo* Infektion bei NIH3T3 nur geringe Gemeinsamkeiten (S11+ vs. NIH3T3+). Die zellulären miRNAs mmu-mir-16 und mmu-mir-15b waren sowohl während der lytischen Replikation als auch nach der Induktion des lytischen Zyklus in der Expression gesteigert. Sie gehören der gleichen miRNA-Familie an, und die gemeinsame Hochregulation konnte in einem *Northernblot* bestätigt werden (siehe Abbildung 21 A). Auf Grund von vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass hsa-mir-15a und hsa-mir-16 in EBV-infizierten NPC (Nasopharynx Karzinom) Proben ebenfalls hochreguliert sind und das Tumorsuppressorgen BRCA1 (*Breast cancer 1*) translational hemmen [Zhu et al., 2009]. Durch eine RT-PCR Untersuchung von nicht-infizierten und infizierten NIH3T3 Proben konnte gezeigt werden, dass BRCA1 ebenfalls durch Infektion mit MHV-68 regulativ gehemmt wird (siehe Abbildung 21 B). Dies deutet auf eine möglicherweise gemeinsame Eigenschaft von Gammaherpesviren hin. Durch Hochregulation von zellulären miRNAs wie mir-15/16 könnten zelluläre Gene in ihrer Expression gehemmt werden. Während die zelluläre miRNA mir-155 spezifisch für B-Zellen ist [Calame, 2007] und während der Infektion in Fibroblasten scheinbar keinen Einfluss hat (siehe Abbildung 21 A und B), wies sie in der Zelllinie S11 die größte Zunahme der Expression nach Reaktivierung auf. Wie bereits in Kapitel 6.3 zur Homologie von miRNAs eingeführt, besitzen KSHV und MDV Orthologe zur zellulären miRNA mir-155 [Skalsky et al., 2007, Zhao et al., 2009], MHV-68 jedoch nicht. Über die Hochregulation der miRNA der Wirtszelle könnte das Fehlen eines Orthologs aber ausgeglichen werden.

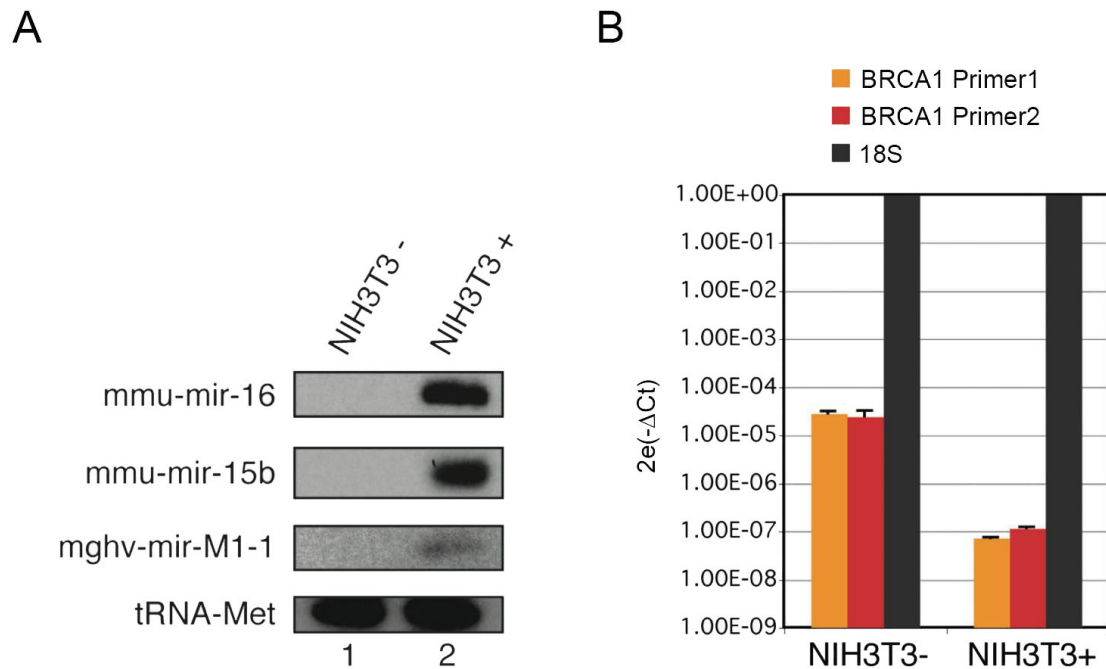


Abbildung 21: Validierung der Expressionsänderung der zellulären miRNAs nach Infektion. A) *Northernblot* auf die zellulären miRNAs mit der größten Veränderung nach Infektion von NIH3T3, mmu-mir-16 und mmu-mir-15b. Die virale miRNA mghv-mir-M1-1 diente dabei als Infektionskontrolle und die Probe gegen tRNA-Met als Ladekontrolle. B) Aus vorhergehenden Experimenten von J. Zhu war für die zelluläre miRNA mmu-mir-16 das *target* BRCA1 (*Breast cancer 1*) bekannt [Zhu et al., 2009]. Die Hochregulation der zellulären miRNAs spiegelt sich in einer Reduktion der Transkripte von BRCA1 nach Infektion mit MHV-68 wider. Die Daten der RT-PCR sind durch zwei verschiedene Primerpaare für das Zielgen BRCA1 aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen und auf das zelluläre ribosomale Transkript 18S normalisiert worden. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD).

6.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der 454-Sequenzierung von Bibliotheken aus MHV-68 infizierten Zelllinien

In dieser Arbeit konnten die neun bereits beschriebenen miRNAs von MHV-68 durch 454-Sequenzierung bestätigt, und sechs bislang nicht beschriebene virale miRNAs identifiziert und über *Northernblot* oder *stem-loop* RT-PCR validiert werden. Damit befinden sich alle jetzt bekannten miRNAs von MHV-68 innerhalb der ersten 6 kbp des linken Genomendes und liegen in direkter räumlicher Nähe hinter einer der acht viralen tRNAs. Damit ergibt sich das Muster der vtRNA-miRNA-miRNA Primärtranskripte. Die daraus resultierende Prozessierung über tRNaseZ führt zur Bildung von pre-miRNA Vorläuferstrukturen, die dann über den normalen Weg der miRNA Reifung über Dicer prozessiert werden. Dies konnte in einem physiologischen *in vitro* Modell mit Dicer -/- MEFs durch einen *Northernblot* bestätigt werden. Bei der Auswertung der zellulären miRNA Sequenzen konnten zahlreiche miRNA* Sequenzen von bekannten miRNAs annotiert werden. Ausserdem war

die Veränderung des Expressionsmusters der zellulären miRNAs nach Infektion durch MHV-68 bzw. Induktion des lytischen Zyklus analysierbar. Die miRNAs mit den größten Unterschieden auf Grund der Infektion konnten durch *Northernblot* bestätigt und durch RT-PCR auf ein bekanntes *target* validiert werden.

7 Charakterisierung der für die weiteren Untersuchungen eingesetzten Viren

Nach der umfassenden Analyse des miRNA-Kodierungspotentials von MHV-68 war die Identifizierung von miRNA-*targets* von großem Interesse. Ein über die BAC-Technologie genetisch verändertes MHV-68, in dem die vor dieser Arbeit bekannten miRNAs deletiert wurden ($\Delta 1-9$), bildete dabei die Arbeitsgrundlage (siehe Kapitel 4.3, Seite 27). Durch Infektion mit der *knock-out* Mutante im Vergleich zu Wildtyp MHV-68 sollten in Mikroarray Experimenten Unterschiede in der Genregulation mögliche Zielgene aufzeigen (siehe Kapitel 8). Dazu war es zunächst notwendig, die miRNA-Expression der eingesetzten Viren zu charakterisieren. Bislang lagen keine Untersuchungen vor, ob zellspezifische Unterschiede in der Expression von viralen miRNAs bestehen, oder ob der virale Lebenszyklus Einfluss auf das exprimierte *set* an miRNAs hat. Durch den Einsatz der Viren Wildtyp, Wildtyp D8J3, $\Delta 1-9$ und $\Delta 1-9$ Revertante bei der Infektion verschiedener Zelllinien *in vitro* (MLE-12, NIH3T3 und Ag8) sollte zum einen die Existenz der maturen miRNAs nachgewiesen werden, aber auch Phänotypen untersucht werden, die durch das Fehlen der miRNAs möglicherweise auftreten. Da bei den humanen Gammaherpesviren EBV und KSHV *in vitro* Untersuchungen beider Stadien des Lebenszyklus auf Grund der ineffektiven Induktion der lytischen Replikation begrenzt sind, kann der Ansatz mit MHV-68 zu neuen Erkenntnissen führen. Bisher konnte den miRNAs von MHV-68 noch keine biologische Funktion zugewiesen werden.

7.1 Vergleichbare lytische Replikation von Wildtyp und Mutante $\Delta 1-9$ in verschiedenen Zelllinien

Bei einer genetischen Veränderung in einem viralen Genom kann es bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu einer Attenuierung kommen. Dies bedeutet, dass das Fehlen einer für die lytische Replikation essentiellen Region die Produktion von Virionen in der Wirtszelle beeinträchtigen kann. Mittels Wachstumskurven in verschiedenen Zelllinien (NIH3T3 und MLE-12) wurde darüber hinaus gleichzeitig der Einfluss der in $\Delta 1-9$ fehlenden miRNAs untersucht. Während der lytischen Replikation hatte die Deletion der

neun miRNAs keinen Einfluss auf die Virionenproduktion in Fibroblasten und alveolären Epithelzellen (siehe Abbildung 22 A und B). Zusätzlich wurde untersucht, ob die in $\Delta 1-9$ fehlenden miRNAs einen Einfluss auf die Virus-Freisetzung aus infizierten Zellen haben. Dazu wurde die Menge an zell-assoziierten Viren und in den Überstand abgegebenen Viren getrennt voneinander ermittelt. Ein Unterschied in den Zellkultur-Überständen mit Virus nach Infektion mit MHV-68 Wildtyp oder $\Delta 1-9$ konnte nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 22 C).

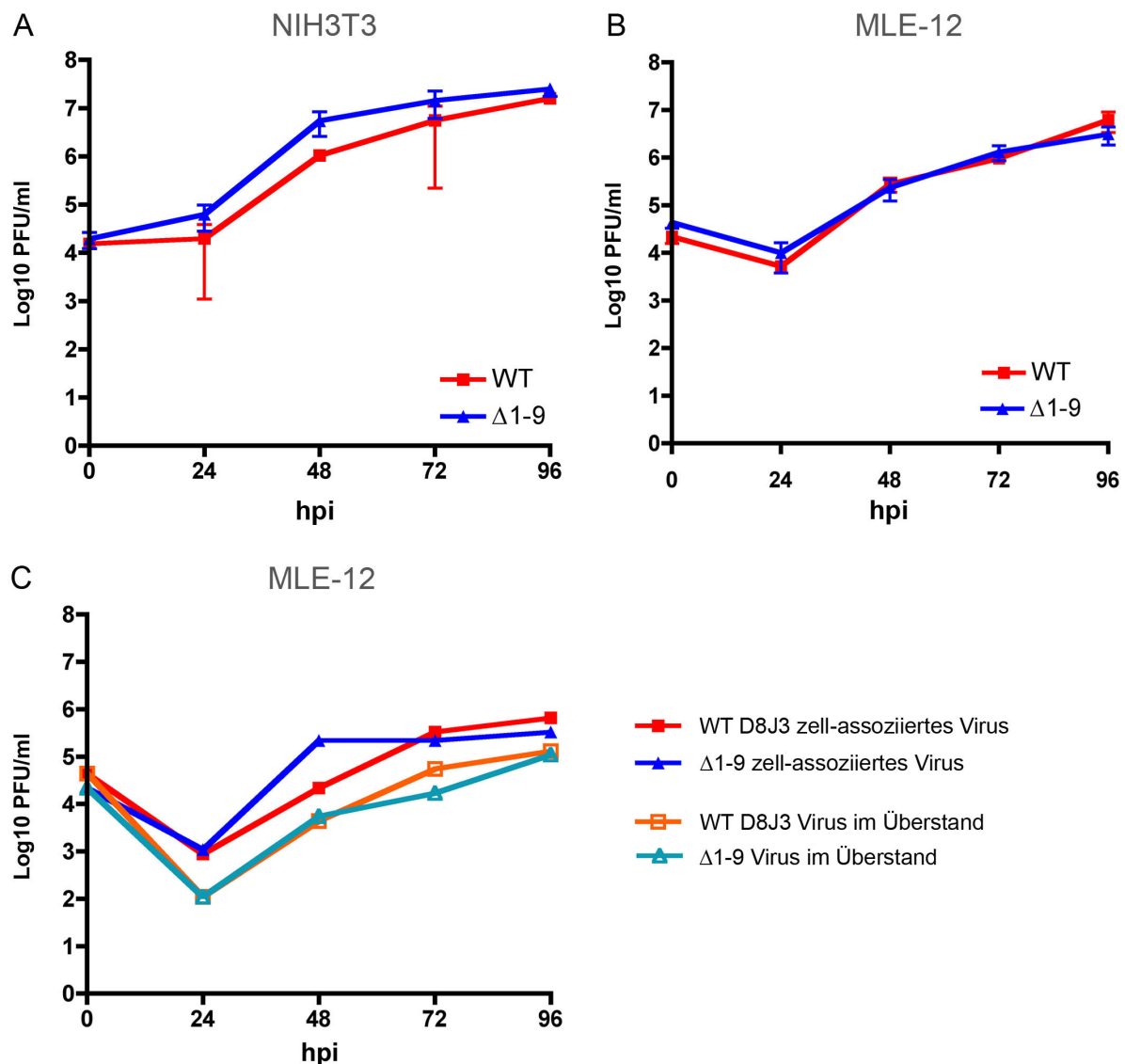


Abbildung 22: Wachstumsverhalten von Wildtyp (WT) und $\Delta 1-9$. A) Wachstumskurve auf NIH3T3 mit WT und $\Delta 1-9$ bei MOI=0,1. B) Wachstumskurve auf MLE-12 mit WT und $\Delta 1-9$ bei MOI=0,1. C) Untersuchung auf Unterschiede im Virionenegress bei WT und $\Delta 1-9$ durch Titerbestimmung des zellfreien Überstands in MLE-12 bei MOI=0,1. Während der lytischen Replikation in MLE-12 findet sich wie unter A) und B) kein Unterschied. In den Überständen besteht ebenfalls kein Unterschied in der Virionenmenge. A) und B) zeigt den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten \pm SD; C) zeigt die Werte eines Unikats. PFU (*plaque forming units*), hpi (*hours post infection*)

7.2 Kein Einfluss der miRNAs auf den Zell-zu-Zell Transfer in verschiedenen Zelllinien

Auch wenn die Analysen des Replikationsverhalten, der Überstände sowie der zell-assoziierten Viren keine Unterschiede in der Freisetzung der Virionen erbrachten, könnten die miRNAs Einfluss auf den Zell-zu-Zell Transfer besitzen. *In vitro* bilden adhärenente Zellen einen konfluenten Zellrasen. Durch fortgeschrittene lytische Replikation bilden sich auf Grund des CPE und der Zelllyse aus Infektionsherden sichtbare Plaques. Bei einer Einflussnahme der viralen miRNAs auf den Zell-zu-Zell Transfer während der lytischen Replikation könnten sich die entstehenden Plaques bei Infektion mit Wildtyp D8J3 und $\Delta 1-9$ in ihrer Anzahl und Größe unterscheiden. Die Analyse der Plaquegrößen und -anzahl in Fibroblasten und alveolären Epithelzellen ergab jedoch keine Unterschiede (siehe Abbildung 23 A und B).

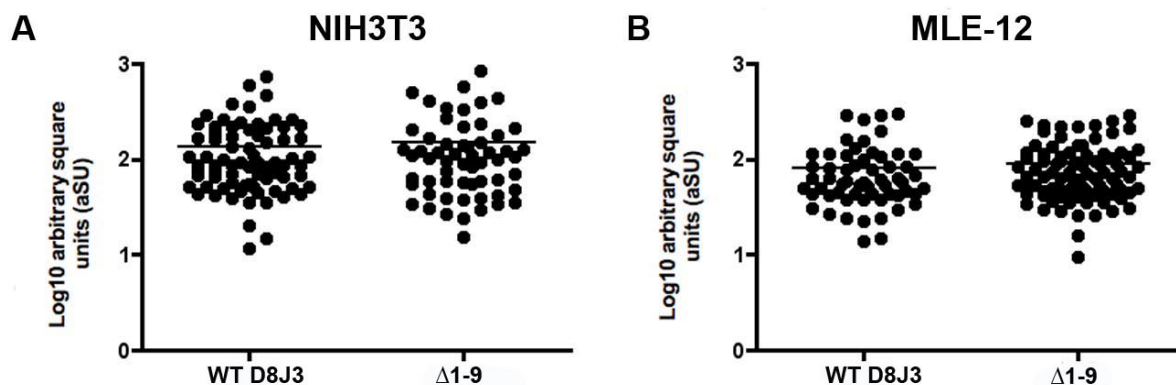


Abbildung 23: Größe der Plaques in den Zelllinien NIH3T3 und MLE-12. A) Infektion von NIH3T3 mit MOI=0,1 mit Wildtyp D8J3 und $\Delta 1-9$ für 72h. B) Infektion von MLE-12 mit MOI=0,1 mit Wildtyp D8J3 und $\Delta 1-9$ für 72h. Die Auswertung erfolgte durch mikroskopische Aufnahmen und Ermittlung der relativen Flächeneinheiten (*aSU*, *arbitrary square units*) aller gefundenen Plaques durch *ImageJ*. Als horizontale Balken sind die Mittelwerte der Flächeneinheiten der Datenpunkte dargestellt. Ein Datenpunkt entspricht einem Plaque und die Gesamtzahl der Datenpunkte resultierte aus zwei unabhängigen Infektionen.

7.3 Nachweis der Expression von miRNAs durch RT-PCR

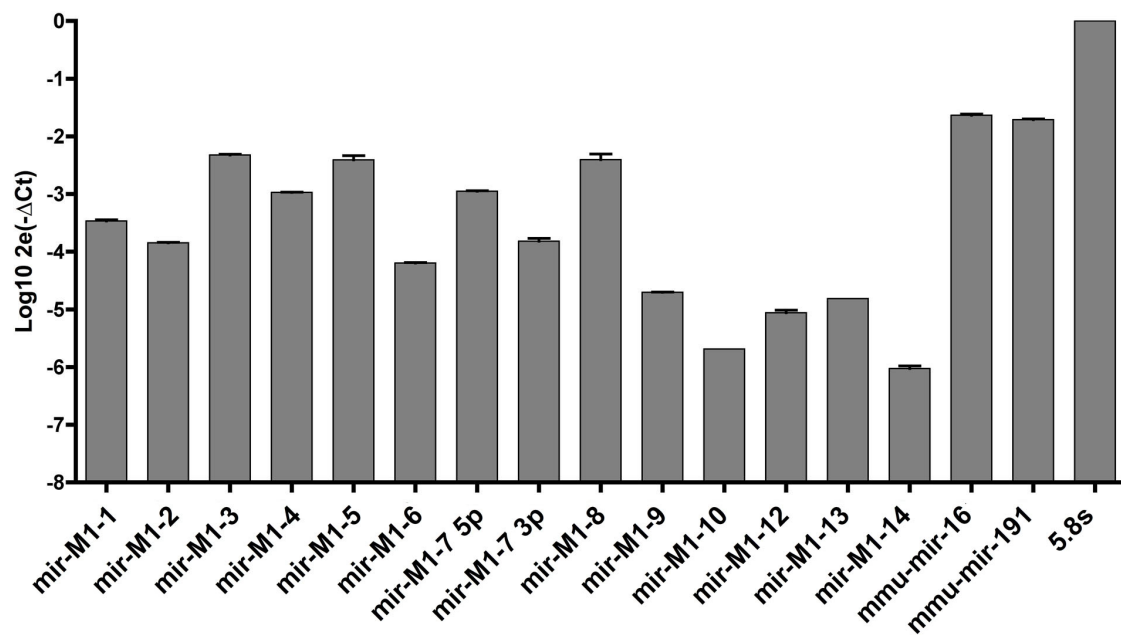
7.3.1 Expression der viralen miRNAs in persistent infizierten B-Zellen S11 und infizierten B-Zellen Ag8

Der Goldstandard für den Nachweis von miRNAs ist der *Northernblot*. Eine effiziente Verarbeitung von mehreren Proben und der Nachweis von verschiedenen miRNAs ist aber sehr aufwändig. Um die Expression der 15 viralen miRNAs während einer Infektion zu untersuchen, wurde eine *stem-loop* RT-PCR entwickelt. Damit kann zu beliebigen Zeitpunkten der Infektion die Expression der miRNAs analysiert werden. Für nachstehende Experimente zur Identifizierung von Zielgenen ist es weiter notwendig, die Expression viraler miRNAs eindeutig detektieren zu können. In der persistent mit Wildtyp MHV-68 infizierten B-Zelllinie S11 konnten durch *stem-loop* RT-PCR alle 15 viralen miRNAs nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24 A). Die aus der RT-PCR erhaltenen Werte zeigen nicht die gleiche Abundanz wie die Analyse der Hochdurchsatz-Sequenzierung (siehe Tabelle 4, Seite 59). Der technische Hintergrund der *stem-loop* RT-PCR wurde in der B-Zelllinie Ag8 durch Infektion mit der miRNA *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$ und nicht-infizierten Zellen ermittelt (siehe Abbildung 24 B). Hier konnten bei der WT Infektion erneut alle viralen miRNAs gezeigt werden. Bei nicht-infizierten Zellen sowie bei der Infektion mit $\Delta 1-9$ wurden die erhaltenen Messwerte für physisch nicht vorhandene miRNAs als Hintergrund definiert (siehe Kapitel 4.3, Seite 27). Dieser *cut-off* Wert wurde für jede virale miRNA individuell bestimmt und liegt zwischen 1^{-8} - 1^{-6} $2^{-\Delta Ct}$. Die Expressionswerte für die miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 liegen bei $\Delta 1-9$ und nicht-infizierten Proben trotz Deletion in gleicher Höhe wie bei der Wildtyp Infektion und sind daher falsch-positiv detektiert. Durch das Ansetzen des individuellen *cut-off* Wertes für jede einzelne miRNA wurde die Nachweisfähigkeit der viralen miRNAs in S11 durch die *stem-loop* RT-PCR angeglichen (siehe Abbildung 24 C). Damit sind mittels der normalen *stem-loop* RT-PCR nur 11 der 15 viralen miRNAs nachweisbar. Die beiden miRNAs mghv-mir-M1-11 und mghv-mir-M1-15 zeigten bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung zu geringe *read*-Zahlen auf, und wurden daher in den Expressionsprofilen nicht berücksichtigt. Für die miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 wurde der Nachweis durch die Verwendung einer *taqman*-Sonde *stem-loop* RT-PCR (siehe Kapitel 5.2.12, Seite 46) versucht. Damit konnte aber lediglich die miRNA mghv-mir-M1-5 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24 D). Selbst diese noch spezifischere Methode konnte für die miRNA mghv-mir-M1-6 keine verlässlichen Expressionswerte erzeugen.

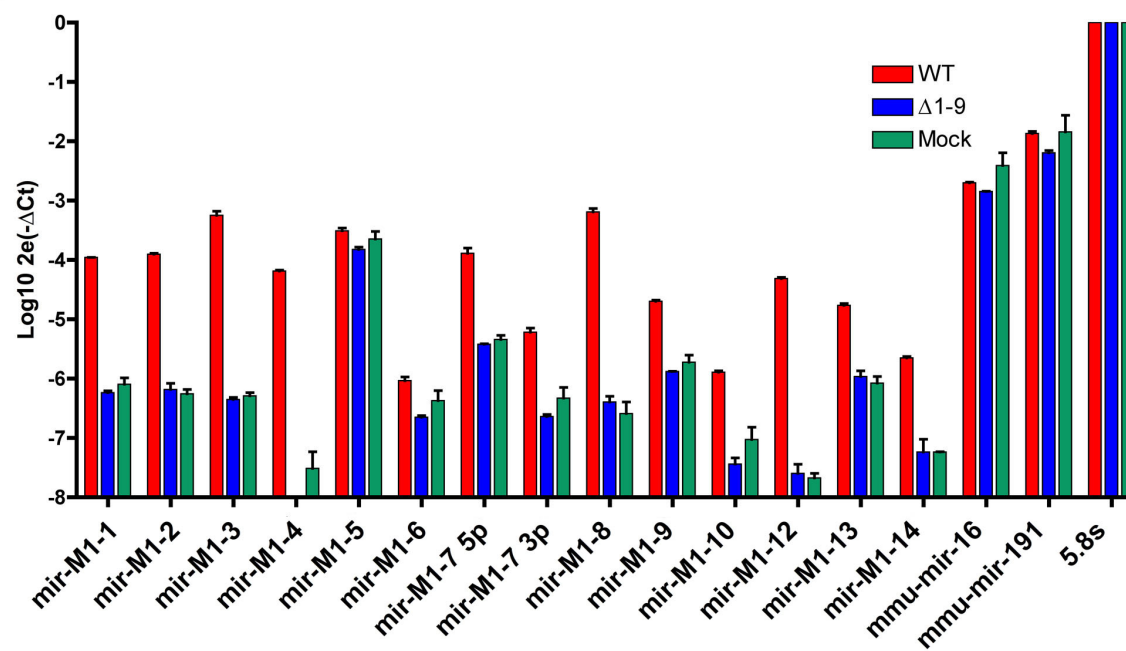
Für genaue Bestimmung eines Phänotyps, der durch eine genetische Veränderung des viralen Genoms entstand, wird in der Virologie oft eine Revertante erzeugt. Eine Re-

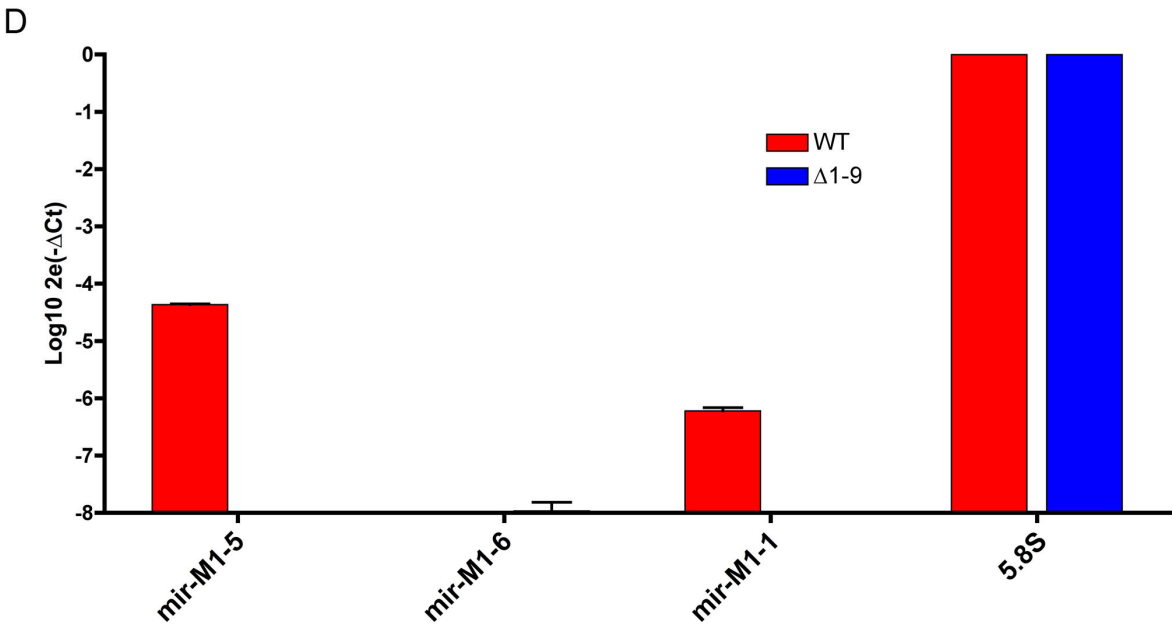
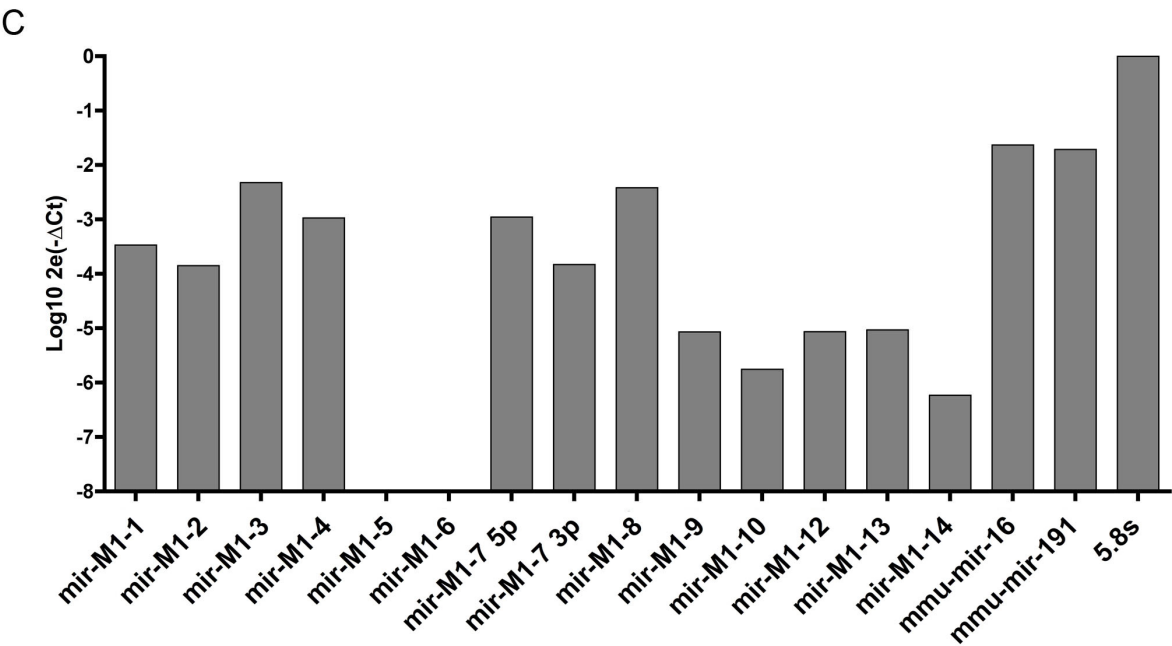
vertante soll dazu dienen, die beobachteten Effekte eindeutig der veränderten Region zuzuschreiben und ausschließen, dass der beobachtete Phänotyp durch unerwünschte Nebeneffekte an anderen Stellen im Genom hervorgerufen wurde. Der Revertante $\Delta 1-9$ wurden die Sequenzen für die fehlenden viralen miRNAs an anderer Stelle wieder eingefügt (siehe Kapitel 4.3, Seite 27). Die Untersuchung der Expression zeigte in der Revertante nahezu wildtyp-level für alle viralen miRNAs, außer mghv-mir-M1-8 (siehe Abbildung 24 E). Dies dürfte auf die Insertion der Revertanten-Sequenz bei der *BglII*-Schnittstelle im Promotorbereich der vtRNA für die miRNA mghv-mir-M1-8 zurückzuführen sein (siehe Abbildung 11, Seite 28).

A



B





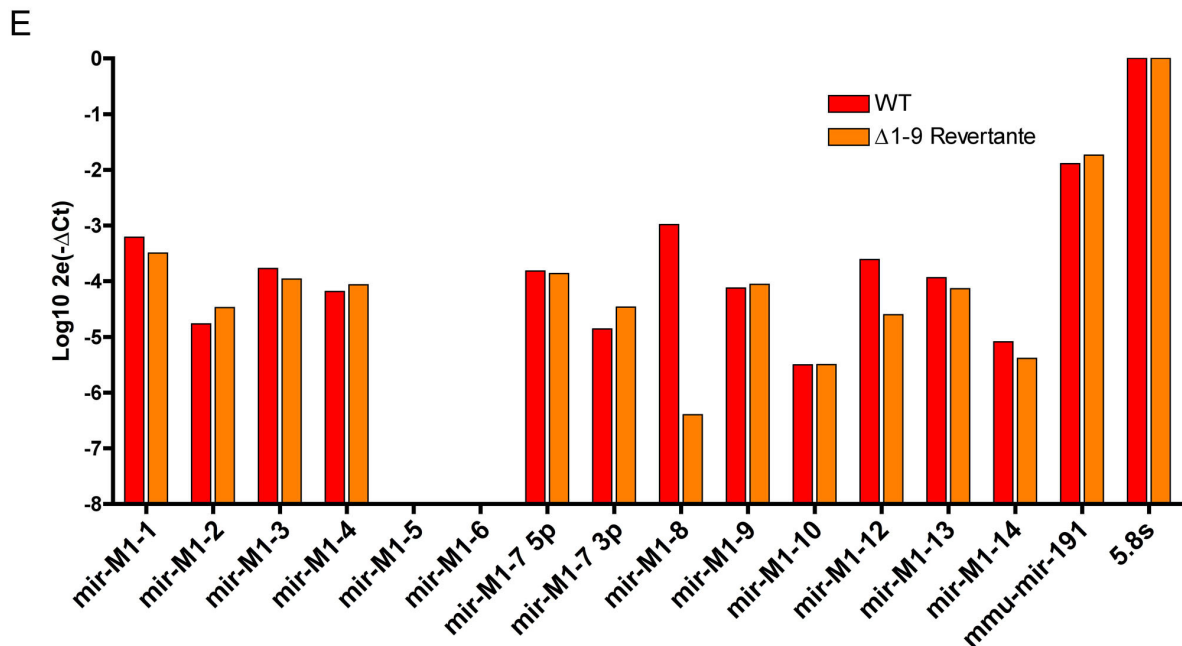


Abbildung 24: Nachweis der Expression der miRNAs von MHV-68 durch *stem-loop* RT-PCR. A) Detektion der 15 viralen miRNAs von MHV-68 in der persistent infizierten B-Zelllinie S11. B) Infektion der murinen B-Zelllinie Ag8 mit WT und der miRNA *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$. Der Vergleich zu einer nicht-infizierten Probe (Mock) erlaubte die Bestätigung der Abwesenheit von miRNA Transkripten, und ermöglichte das Festlegen eines für jede miRNA individuellen *cut-off* Wertes als technischen Hintergrund. Die Detektion der miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 war durch die *SYBR-green stem-loop* RT-PCR nicht möglich. C) Die Bereinigung der Messwerte vom technischen Hintergrund ergibt in S11, dass nur 11 der 15 viralen miRNAs detektierbar sind. D) Um die miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 nachzuweisen, wurde für diese eine *tagman*-Sonde *stem-loop* RT-PCR in WT und $\Delta 1-9$ infizierten Ag8 durchgeführt. Dadurch konnte lediglich die miRNA mghv-mir-M1-5 eindeutig detektiert werden. E) Nach einer Infektion von Ag8 mit WT und $\Delta 1-9$ Revertante wurde die miRNA Expression der beiden Viren verglichen. Die Revertante zeigte für die mit einer normalen *stem-loop* RT-PCR nachweisbaren viralen miRNAs die gleichen Werte wie bei einer WT Infektion. Lediglich mghv-mir-M1-8 exprimiert die Revertante deutlich schwächer. Die Expressionswerte in A-E sind auf die rRNA 5.8S normalisiert. Die zellulären miRNAs mmu-mir-16 und mmu-mir-191 dienen als technische und biologische Positiv Kontrolle. Bei den Werten der Graphen C bis E wurde der in B ermittelte technische Hintergrund abgezogen.

7.3.2 Expression der viralen miRNAs während der lytischen Replikation in Fibroblasten

Bislang liegen keine Studien zur Expression aller viralen miRNAs von MHV-68 während der lytischen Replikation vor. Für die miRNA mghv-mir-M1-1 und mghv-mir-M1-5 wurde bereits eine RLM-RT-PCR (*reverse ligation mediated* RT-PCR) während der lytischen Replikation in NIH3T3 *in vitro* und in C57BL/6J Mäusen während der akuten und latenten Phase beschrieben [Diebel et al., 2010]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die vtRNA Transkripte als Marker für die Latenz gelten [Bowden et al., 1997, Simas et al., 1998], aber auch während der lytischen Replikation von Anfang an exprimiert werden, wo sie

jedoch erst ab 24 hpi eindeutig über der Nachweisgrenze liegen [Martinez-Guzman et al., 2003]. In einer anderen Arbeit wurde die Inkorporation der vtRNA Transkripte in das Virion von MHV-68 beobachtet [Cliffe et al., 2009]. Dies würde bedeuten, dass funktionale miRNAs bereits unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle operieren könnten. Um das Expressionsverhalten der viralen miRNAs während der lytischen Replikation zu untersuchen, wurden NIH3T3 mit Wildtyp und $\Delta 1-9$ für 48 Stunden infiziert sowie eine nicht-infizierte Kontrolle zur Bestimmung des Hintergrunds verwendet. Ausgewählte miRNAs von verschiedenen vtRNA-Transkripten sind dabei repräsentativ für die Gesamtzahl der viralen miRNAs verwendet worden (siehe Abbildung 25 A). Die viralen miRNAs konnten nach 48 Stunden einer WT Infektion eindeutig nachgewiesen werden.

Für die in der Mutante nicht fehlenden miRNAs mghv-mir-M1-13 und mghv-mir-M1-14 zeigte sich die falsch-positive Detektion bei mghv-mir-M1-13 auf Grund einer bei *SYBR-green* RT-PCR üblichen Schmelzpunktanalyse (T_m) als unspezifisches Artefakt. Es zeigt jedoch, dass bei Abwesenheit der maturen miRNA für einzelne miRNAs Detektionsschwierigkeiten für die *stem-loop* RT-PCR bestehen. Damit war es aber dennoch möglich eine umfassende Analyse der Expression der viralen miRNAs zu verschiedenen Zeitpunkten der lytischen Replikation durchzuführen (siehe Abbildung 25 B). Bei dieser Analyse wurde RNA in einem Zeitverlauf von 0-48 Stunden gewonnen und mittels RT-PCR untersucht. Das Experiment war auf 0-96 Stunden ausgelegt, es zeigte sich jedoch, dass bereits bei 72 Stunden auf Grund des CPE (Cytopathischer Effekt) zu geringe RNA Mengen extrahiert werden konnten. Der Zeitverlauf zeigt, dass in den ersten Stunden der Infektion (2-8 hpi) keine maturen viralen miRNAs präsent sind. Die Detektion war erst 8 hpi für einzelne miRNAs möglich. Bis zum Ende des Zeitverlaufs konnte bei allen miRNAs eine stete Zunahme beobachtet werden. Die Wirkzeit für die viralen miRNAs ist auf Grund des CPE und der anschließend stattfindenden Zelllyse somit während der lytischen Replikation stark begrenzt.

Die durchgehenden Werte für mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 sind auf Grund der bereits angeführten Ergebnisse als falsch-positiv zu betrachten (siehe Kapitel 7.3.1). Die Werte für mghv-mir-M1-13 bei der Negativ-Kontrolle (0 hpi) und bei 2 hpi sind nach der Analyse des T_m ebenfalls ein falsch-positives Signal. Damit konnten unmittelbar nach Beginn der Infektion keine maturen miRNAs festgestellt werden. Das erhaltene Ergebnis deckt sich mit der von Martinez-Guzman et al. [2003] und Ebrahimi et al. [2003] beschriebenen Beobachtung, dass die vtRNAs einen Höchststand während der lytischen Replikation ab 32 hpi erreichen. Für die miRNA mghv-mir-M1-1, die bereits über RLM-RT-PCR in NIH3T3 während der lytischen Infektion gezeigt wurde, stimmte der Zeitpunkt der Detektion bei 24 hpi überein [Diebel et al., 2010]. Die zweite von den Autoren untersuchte

miRNA, mghv-mir-M1-5 konnte von ihnen jedoch bereits ab 6 hpi detektiert werden.

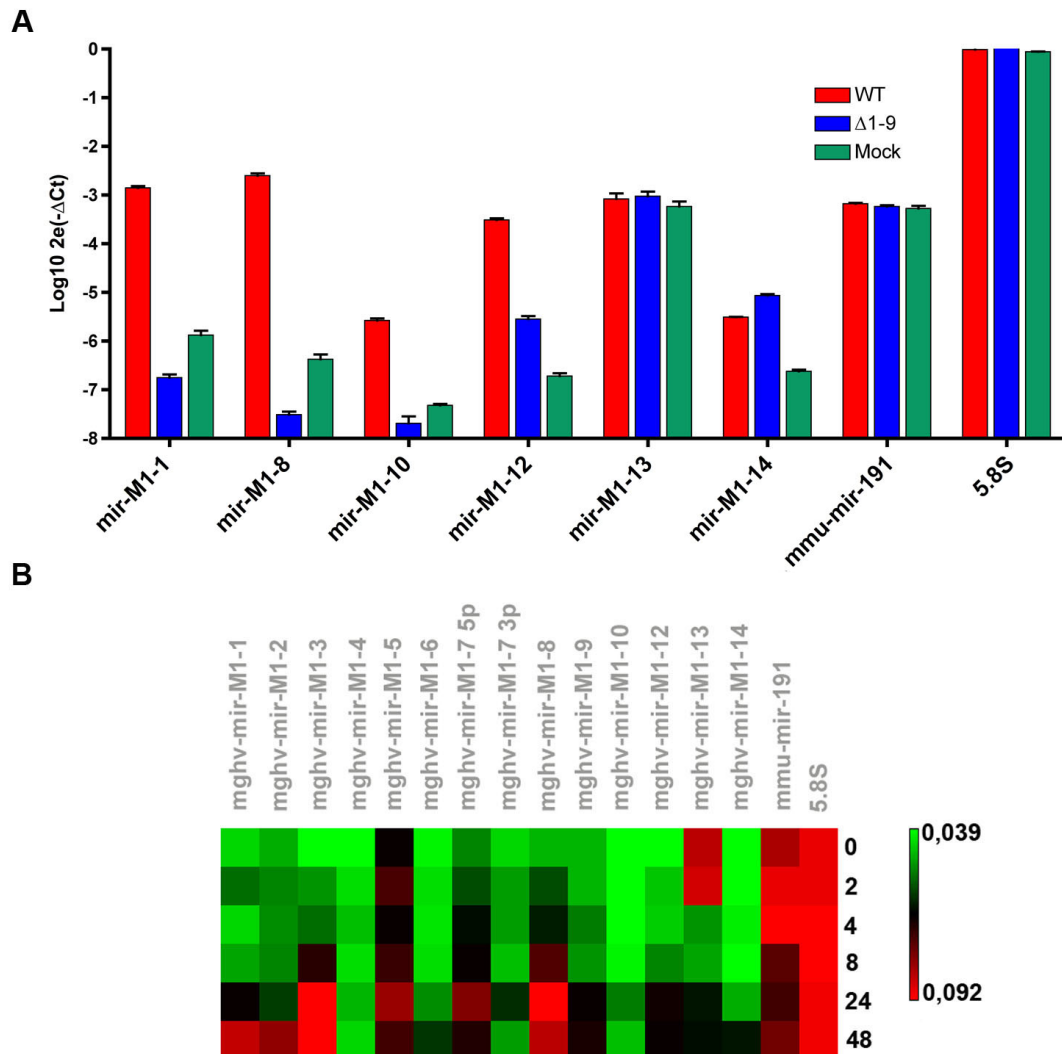


Abbildung 25: Expression der miRNAs von MHV-68 während der lytischen Replikation in der Fibroblasten Zelllinie NIH3T3. A) Analyse ausgewählter viraler miRNAs verschiedener vtrRNA Transkripte durch *stem-loop* RT-PCR in NIH3T3 Zellen infiziert mit MHV-68 Wildtyp und MHV-68 Δ 1-9 im Vergleich zu einer nicht-infizierten Kontrolle (Mock). B) Zeitverlauf der Expression der viralen miRNAs von MHV-68 während der lytischen Replikation in NIH3T3. Die maturen miRNAs sind vereinzelt bereits ab 8 hpi detektierbar, jedoch finden alle ihr Expressionsmaximum zwischen 24 und 48 hpi. Der technische Hintergrund bei der Detektion der miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 führte zu falsch-positiven Werten. Ebenfalls konnten die Werte für mghv-mir-M1-13 bei 0-2 hpi nach einer Schmelzpunktanalyse (T_m) als falsch-positiv bewertet werden. Die Darstellungen sind auf die ribosomale rRNA 5.8S normalisiert und zeigen die zelluläre miRNA mmu-mir-191 als Positiv Kontrolle. Die Werte in B sind in $1/\Delta C_t$ aufgezeigt.

7.3.3 Nachweis von miRNAs in verschiedenen Geweben aus *in vivo* Proben

MHV-68 gilt als Kleintier-Modell für Infektionen mit den genetisch verwandten, humanen Gammaherpesviren KSHV und EBV. Durch die Infektion von Mäusen mit MHV-68 Mu-

tantan können Untersuchungen zum Einfluss einzelner viraler Gene auf die Pathogenese durchgeführt werden. Die Deletion der miRNAs mghv-mir-M1-1 bis -9 in der Mutante $\Delta 1-9$ ermöglicht die Analyse ihrer Funktion in einem physiologischen Hintergrund. Diese Untersuchungen sind auf Grund der noch fortlaufenden Experimente aber nicht Bestandteil dieser Arbeit. Für eine eindeutige Zuordnung von möglicherweise auftretenden Phänotypen ist der Nachweis der viralen miRNAs aus *in vivo* Proben notwendig. Dazu wurden aus mit WT infizierten Mäusen Lungen und Milzen analysiert. Die gewählten Zeitpunkte Tag 3 und Tag 5 (D3, D5) zur Entnahme der Lungen liegen im Zeitraum der lytischen Replikation. Die Zeitpunkte Tag 21 und Tag 45 (D21, D45) entsprechen in der Milz der frühen Latenz und der Langzeit-Latenz. Durch die Verwendung des normalen RNA Extraktionsprotokolls für den Nachweis von miRNAs mittels RT-PCR konnten nur vereinzelt die ausgewählten viralen miRNAs detektiert werden (siehe Abbildung 26 A). Während die zelluläre miRNA mmu-mir-191 und die ribosomale RNA 5.8S stets eindeutig nachweisbar waren, fand sich bei der Probe der Lunge von Tag 3 lediglich die virale miRNA mghv-mir-M1-1 und in der Milz nur an Tag 21 die miRNA mghv-mir-M1-8. Aus den während der Hochdurchsatz-Sequenzierung ermittelten Häufigkeiten abgeleitet, sollte mghv-mir-M1-1 während der lytischen Replikation und der Latenz in größeren Mengen als mghv-mir-M1-8 exprimiert vorliegen. Aus den Untersuchungen von Diebel et al. [2010] war bekannt, dass für den Nachweis von miRNAs aus *ex vivo* Proben ein spezielles Extraktionsprotokoll zur Anreicherung der miRNA Fraktion verwendet werden muss. Mit dem MiniElute Cleanup Kit (Qiagen) war der eindeutige Nachweis der ausgewählten viralen miRNAs mghv-mir-M1-1 und mghv-mir-M1-8 aus den *ex vivo* Proben möglich (siehe Abbildung 26 B). Eine Übereinstimmung der Verhältnisse der Abundanz aus der Hochdurchsatz-Sequenzierung konnte mit *stem-loop* RT-PCR grundsätzlich nicht erzielt werden. Eine Zu- und Abnahme der Transkripte in den einzelnen Organen, gegebenenfalls im Rahmen des viralen Lebenszyklus konnte jedoch gezeigt werden.

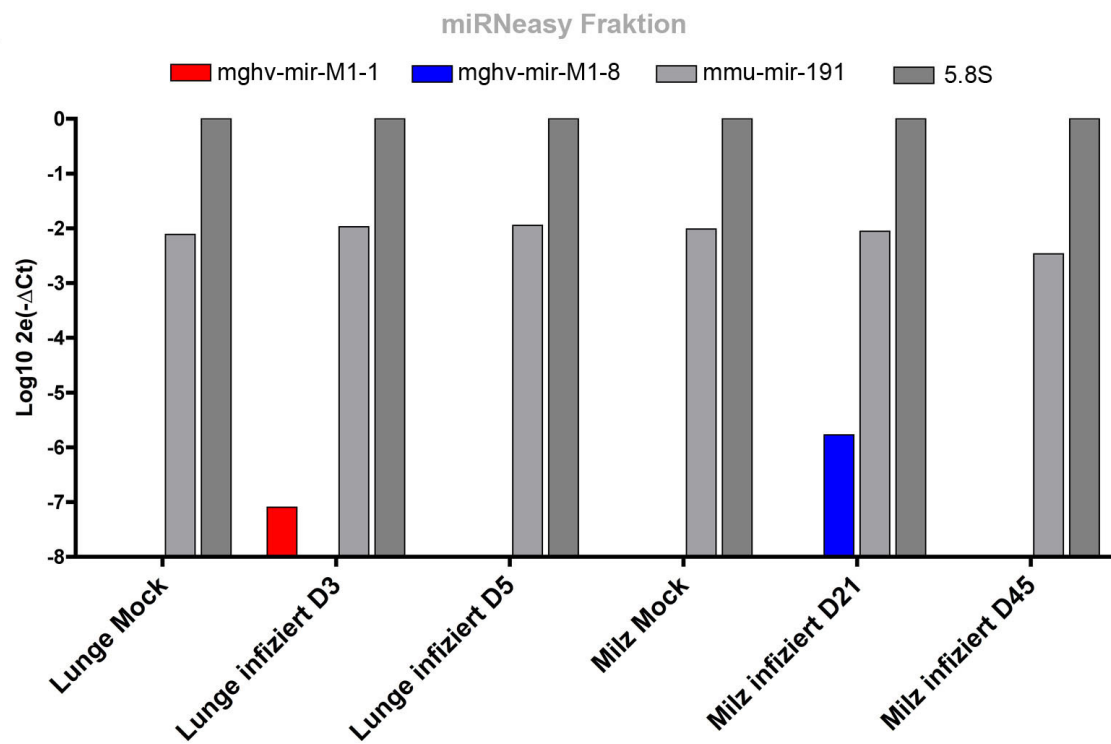
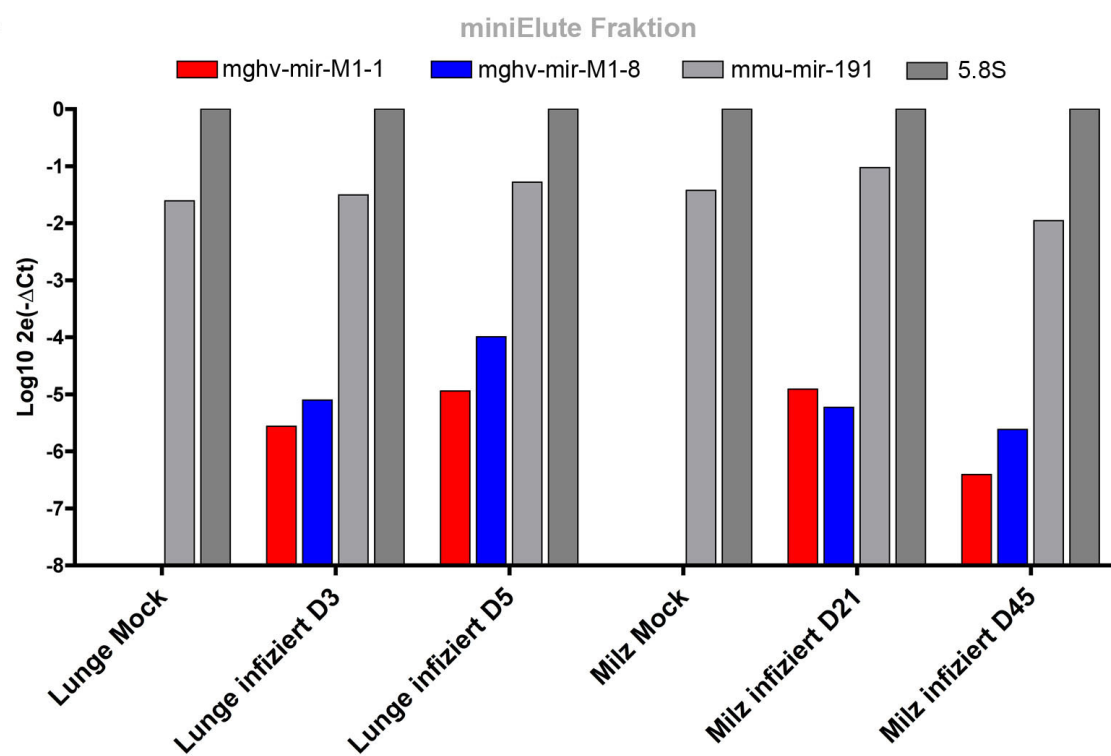
A**B**

Abbildung 26: Nachweis von viralen miRNAs in *ex vivo* Proben. A) Nach Extraktion mit dem Standard-miRNeasy Kit (Qiagen) konnten die viralen miRNAs nur unzureichend detektiert werden. B) Durch Anwendung des Protokolls für das MiniElute Cleanup Kit (Qiagen) wurden die viralen miRNAs in den einzelnen Organen eindeutig aufgezeigt. Die Normalisierung der Daten erfolgte auf die rRNA 5.8S, und die zelluläre miRNA mmu-mir-191 diente als Positiv Kontrolle. Gezeigt sind die auf rRNA 5.8S normalisierten Werte von denen der Hintergrund abgezogen wurde. Die verwendeten Organe entstammen jeweils einem Tier (C57BL/6J Mäuse).

7.4 Virale Genexpression bei MHV-68 Wildtyp und Mutanten

Die viralen miRNAs sind nicht nur in der Lage zelluläre Transkripte zu regulieren, sondern könnten auch auto-regulatorische Einflüsse auf virale Transkripte besitzen. Dies würde sich bei der Infektion mit einer miRNA *knock-out* Mutante im Vergleich zu Wildtyp in einer erhöhten Transkription des möglichen viralen Zielgens zeigen. Darüber hinaus kann eine genetische Veränderung des Wildtyp Genoms zu einer Beeinträchtigung der Expression der Nachbargene führen. Um die Expression viraler Transkripte nach Infektion mit der Mutante $\Delta 1-9$ mit der Wildtyp Infektion vergleichen zu können, wurde eine RT-PCR auf ausgewählte Gene durchgeführt. Dazu wurden die Zelllinien Ag8 und NIH3T3 mit $\Delta 1-9$ und WT für 48 Stunden infiziert. Die B-Zelllinie Ag8 wurde zusätzlich mit der Revertante infiziert. Die Analyse konnte in beiden Zelllinien keine Zunahme eines viralen Transkripts detektieren (siehe Abbildung 27 A und B) und lässt somit auf kein virales Gen als direktes *target* einer der fehlenden viralen miRNAs schließen. Die Normalisierung der RT-PCR erfolgte bei der Zelllinie Ag8 auf das zelluläre Transkript L8, welches sich bei der lytischen Replikation in NIH3T3 aber zu stark veränderte. Daher erfolgte bei NIH3T3 die Normalisierung der Expressionswerte auf das virale Transkript ORF50.

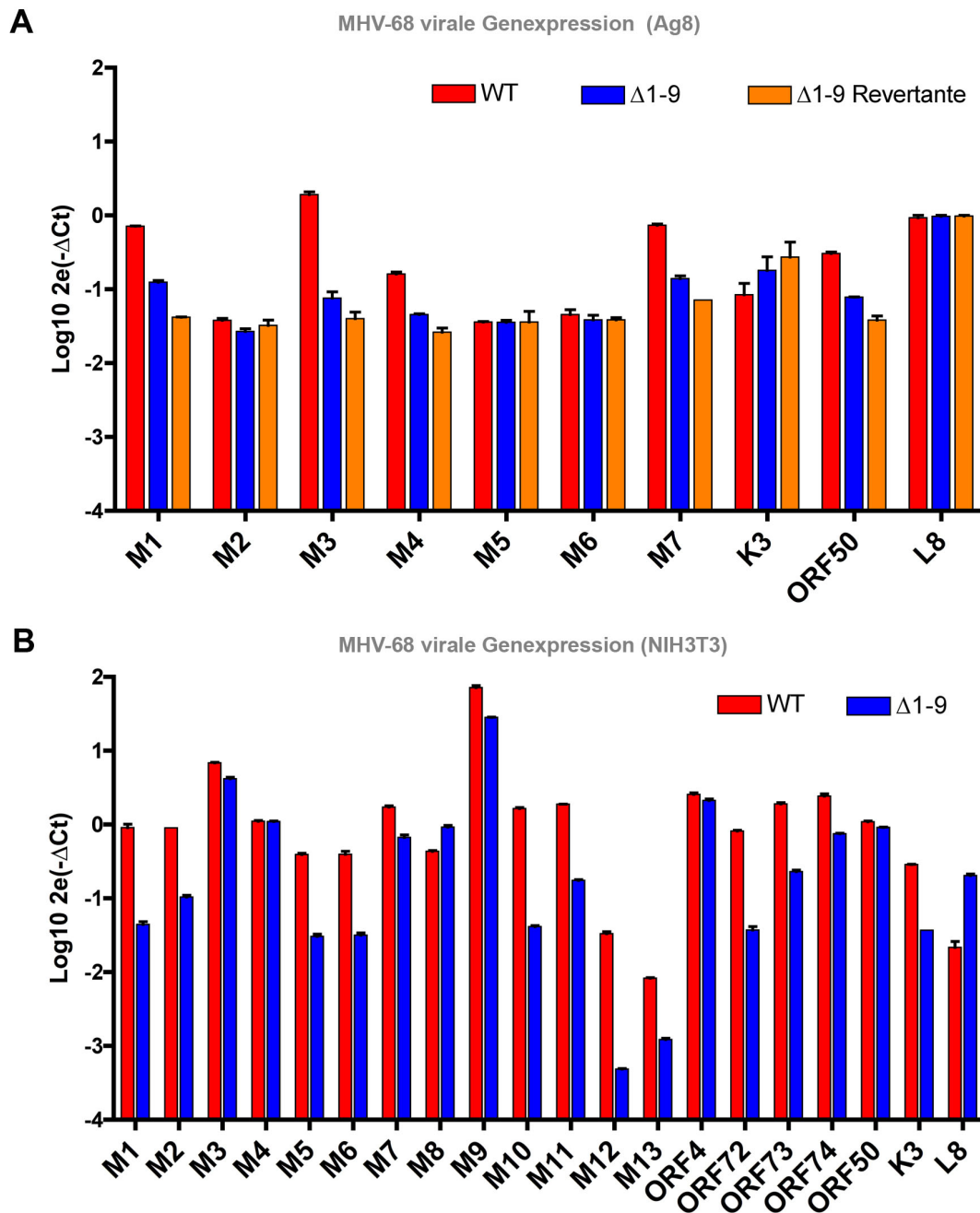


Abbildung 27: Analyse der Expression von viralen Genen. A) Untersuchung der Expression von viralen Genen in der B-Zelllinie Ag8. Infektion von Ag8 mit Wildtyp MHV-68 (WT), $\Delta 1-9$ Revertante ($\Delta 1-9$ Rev) und $\Delta 1-9$. Es konnten keine viralen Transkripte in der Infektion mit der miRNA *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$ mit einer gesteigerten Expression nachgewiesen werden. Dies lässt für die hier aufgeführten viralen Gene keine Hinweise auf direkte virale *targets* durch virale miRNAs in Ag8 zu. B) Analyse der Expression von viralen Genen in der Fibroblasten Zelllinie NIH3T3. Infektion von NIH3T3 mit WT und $\Delta 1-9$. Es konnte ebenfalls keines der untersuchten viralen Transkripts als mögliches direktes *target* für die viralen miRNAs festgestellt werden. Die Normalisierung in A) erfolgte auf das zelluläre Transkript L8. In der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (B) unterlag L8 jedoch zu starken Schwankungen. Daher erfolgte die Normalisierung der Expressionswerte auf das virale Transkript ORF50.

7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der für diese Arbeit eingesetzten Viren

Da für die *target*-Identifizierung Wildtyp MHV-68 und die miRNA *knock-out* Mutante Δ 1-9 eingesetzt werden sollten, wurden diese beiden Viren zunächst näher charakterisiert. Die Analyse der lytischen Replikation von beiden Viren zeigte in verschiedenen Zelllinien keine Unterschiede im Wachstum. Ebenfalls konnten keine Unterschiede bei der Freisetzung der Virionen in den Zellüberstand sowie beim Zell-zu-Zell Transfer gezeigt werden. 11 der 15 miRNAs von MHV-68 konnten durch eine *stem-loop* RT-PCR nachgewiesen werden. Eine miRNA (mghv-mir-M1-5) konnte über eine *tagman*-Sonde *stem-loop* RT-PCR detektiert werden. Die miRNA mghv-mir-M1-6 konnte durch keine Methode nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die miRNAs während der lytischen Replikation, übereinstimmend mit Angaben aus der Literatur für die vtRNA-Expression, erst ab 8-24 hpi detektierbar sind. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit ein Protokoll zum Nachweis von viralen miRNAs aus *in vivo* Proben etabliert werden. Durch eine RT-PCR Analyse der viralen Genexpression konnte kein virales Gen als *target* identifiziert werden.

8 Analyse der Zielsequenzen der miRNAs von MHV-68

Durch die Hochdurchsatz-Sequenzierung der sRNA Fraktion liegt eine wahrscheinlich erschöpfende Analyse des miRNA Kodierungspotenzials von MHV-68 vor (siehe Kapitel 6). Die Funktion der miRNAs ist jedoch bis dato unbekannt. Zur Identifizierung der Zielsequenzen der 15 viralen miRNAs wurden zwei Vorgehensweisen kombiniert. Mittels bioinformatischer Vorhersage wurden Sequenzen von zellulären Genen auf die Komplementarität zu den *seed*-Sequenzen der vmiRNAs untersucht. Das Ergebnis beinhaltet mögliche Kandidaten für eine vmiRNA-vermittelte Regulation, die jedoch noch nicht auf eine tatsächliche biologische Funktion validiert sind. In einem zweiten Ansatz wurden die Zelllinien MLE-12 und Ag8 als Modell für die zwei replikativen Zustände (lytische Replikation bzw. persistente Infektion) mit den Viren Wildtyp und Δ 1-9 infiziert, und die Unterschiede in der zellulären Genexpression durch Mikroarray-Analyse untersucht. Da miRNAs grundsätzlich zur Inhibition eines Transkripts führen, lag der Schwerpunkt bei der Analyse der unterschiedlichen Genexpression zwischen WT und Δ 1-9 auf den hochregulierten Genen. Das Anlegen eines willkürlich gewählten Wertes als Ausschlusskriterium führte zu einer stringenten Liste möglicher Kandidaten. Diese resultieren entweder aus

einer direkten Inhibition durch die viralen miRNAs oder unterscheiden sich in der Expression durch indirekte Einflüsse auf Grund der Infektion. Über eine Kombination aus bioinformatischer Vorhersage einer *target-site* innerhalb der Transkriptsequenz und der experimentell beobachteten Unterschiede im Mikroarray-Experiment konnte die Kandidatenliste auf mögliche direkte *targets* eingeschränkt werden (siehe Abbildung 28).

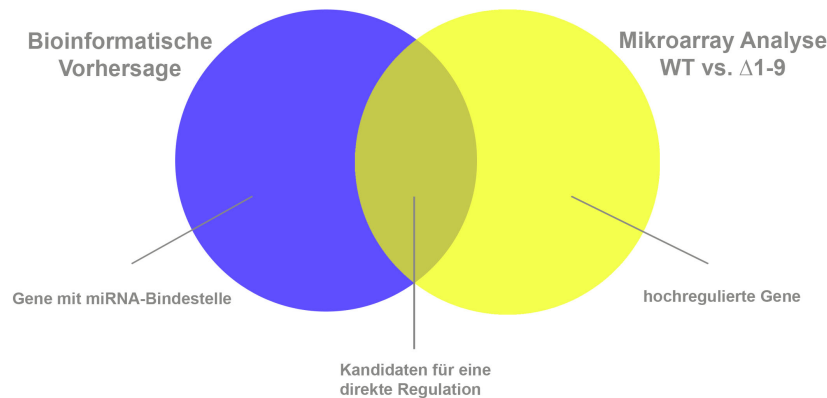


Abbildung 28: Schema der Kombination der zwei angewendeten Methoden zur *target*-Identifizierung.

8.1 Bioinformatische Vorhersage

Mit dem Webtool TargetScan (www.targetscan.org; v5.2) konnten durch die Eingabe der *seed*-Sequenz einer spezifischen miRNA die Gene aufgelistet werden, die eine Bindestelle in der 3'-UTR komplementär zur eingegebenen Sequenz besitzen. Die resultierende Auflistung der möglichen *targets* (Zielgene) pro *seed*-Sequenz ist nach der Art der Bindung (*seed-match type*; siehe Abbildung 10, Seite 25) sortiert und zeigt auch die Anzahl der konservierten *sites* (siehe Tabelle 6). Eine Diskrepanz zwischen der Anzahl der *sites* und der Gesamtzahl der konservierten *targets* ergibt sich durch die Möglichkeit der Regulation eines Gens durch mehrere verschiedene miRNAs oder mehrfach durch eine einzelne [Grimson et al., 2007]. Die Eingabe der 17 *seed*-Sequenzen der 15 miRNAs von MHV-68 ergab 2805 mögliche Zielgene. Von diesen gingen 439 Gene mit mehr als einer Bindestelle für eine virale miRNAs als sogenannte Dublette hervor (siehe Tabelle 6). Die Bereinigung der Gesamtzahl durch die Dubletten ergab die tatsächliche, einfache Anzahl der Zielgene von 2366. Eine prozentuale Aufteilung der Gesamtzahl der Zielgene auf die jeweiligen viralen miRNAs führte zu einer Darstellung der Relevanz und des möglichen Regulationseinflusses einer einzelnen miRNA von MHV-68 (siehe Abbildung 29 A; Werte aus Tabelle 6). In dieser fielen vor allem mghv-mir-M1-1 und mghv-mir-M1-9 auf, deren Anzahl möglicher Zielgene deutlich über dem Durchschnitt der anderen viralen miRNAs liegt. Eine Aufschlüsselung der 439 Dubletten in die Anzahl der Gene in Abhängigkeit der Anzahl der

vorhergesagten Bindestellen brachte neben dem Hauptteil von zwei und drei Bindestellen nur eine kleine Menge von Genen hervor, die durch mehr als vier bis maximal sieben verschiedene virale miRNAs reguliert sein könnten (siehe Abbildung 29 B).

miRNA Name	seed-Sequenz	kons. Targets	kons. Sites	% von Total
mghv-mir-M1-1	AGAAAUG	546	584	19,47
mghv-mir-M1-2	AGACCCC	49	49	1,75
mghv-mir-M1-3	AGGUGAG	83	83	2,96
mghv-mir-M1-4	CGAGGAG	5	5	0,18
mghv-mir-M1-5	GAGUUGA	66	68	2,35
mghv-mir-M1-6	GAAACUG	187	194	6,67
mghv-mir-M1-7 5p	AAGGUGG	94	95	3,35
mghv-mir-M1-7 3p	AUAUCGC	4	4	0,14
mghv-mir-M1-8	GCACUCA	92	92	3,28
mghv-mir-M1-9	CACAUUU	741	813	26,42
mghv-mir-M1-10	GAUUACA	171	175	6,10
mghv-mir-M1-11 5p	GCUGUCA	119	119	4,24
mghv-mir-M1-11 3p	GUAACCC	41	41	1,46
mghv-mir-M1-12	UUGGUGU	217	223	7,74
mghv-mir-M1-13	AUCUCAU	89	93	3,17
mghv-mir-M1-14	GCUACAG	255	262	9,09
mghv-mir-M1-15	GCUACCC	46	47	1,64
Total	2805			100,00
Dubletten	439			15,65
Total bereinigt	2366			

Tabelle 6: Die 15 viralen miRNAs von MHV-68 mit ihrer *seed*-Sequenz und der Anzahl der durch TargetScan (v5.2) vorhergesagten konservierten *targets* sowie konservierten *sites*. 439 Gene sind dabei mögliche Ziele von mehr als einer viralen miRNA von MHV-68 (Dubletten).

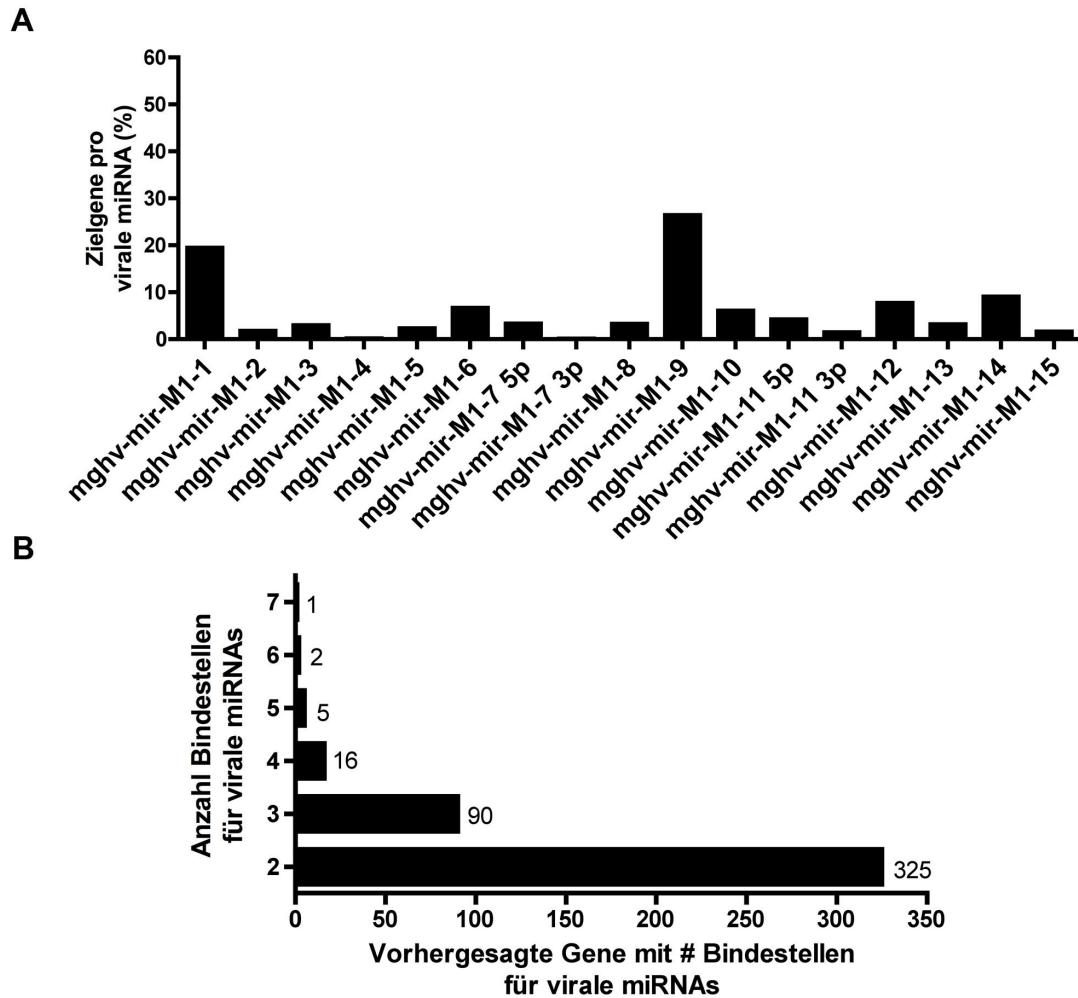


Abbildung 29: A) Verteilung der 2805 bioinformatisch vorhergesagten möglichen *targets* auf die 17 viralen *seed*-Sequenzen von MHV-68 in Prozent (siehe Tabelle 6). B) Verteilung der Gene mit mehr als einer vorhergesagten Bindestelle (Dublette) für eine virale miRNA von MHV-68.

8.2 Mikroarray-Analyse der infizierten Zelllinien

Der experimentelle Ansatz zur Identifizierung von *targets* der miRNAs von MHV-68 über die Analyse der Genexpression basiert auf der Verwendung der miRNA *knock-out* Mutante Δ 1-9. Anwesende virale miRNAs führen zu einer translationalen Inhibition der Genexpression in der Wirtszelle (siehe Kapitel 2.1.4, Seite 18). Die Deletion der miRNAs in der Mutante Δ 1-9 sollte deshalb zu einer spezifischen Hochregulation der direkten Zielgene führen. Da über die bioinformatische Betrachtung keine zell- und lebenszyklusspezifische Aussage möglich ist, wurden für die Zuordnung von Zielgenen während der lytischen Replikation und der persistenten Infektion die Zelllinien MLE-12 und Ag8 jeweils mit WT und Δ 1-9 infiziert. In beiden Zelllinien wies jeweils eine größere Anzahl aus den signifikant

regulierten Genen eine erhöhte Expressionsrate auf (siehe Tabelle 7). Die *cut-off* Werte sind bei beiden Zelllinien willkürlich festgelegt. Da aber in der Literatur für miRNAs eher moderate Regulationseinflüsse diskutiert werden, sind die verwendeten Ausschlusswerte sehr sensitiv gewählt. Der Fokus auf die hochregulierten Gene berücksichtigt dabei aber noch nicht die Möglichkeit, dass über die Infektion die Genexpression unabhängig einer Regulation durch virale miRNAs induziert werden kann. Darüber hinaus können auch Inhibitoren oder Repressoren durch virale miRNAs inhibiert werden, was wiederum zu einer unspezifischen Hochregulation eines Transkripts führt. Die durch diese sekundären Effekte betroffenen Gene sind als falsch-positive Kandidaten über die Kombination mit weiteren Ansätzen der Identifizierung von Zielgenen viraler miRNAs auszusortieren.

	MLE-12	Ag8
signifikant regulierte Gene	786	705
<i>cut-off</i> (linear)	1,38x	1,25x
hochreguliert	590	484
herunterreguliert	196	221
match zu TargetScan	87	79
hochreguliert	70	46
herunterreguliert	17	33

Tabelle 7: Ergebnisse der Mikroarray-Analyse nach Infektion der Zelllinien MLE-12 und Ag8 mit Wildtyp MHV-68 und $\Delta 1-9$.

8.3 Kombination der Ansätze zur *target*-Identifizierung von viralen miRNAs

Um die Ergebnisse aus dem Mikroarray von möglichen indirekt beeinflussten Genen zu bereinigen war der Vergleich mit den bioinformatisch vorhergesagten Genen notwendig. Die 2366 Gene, welche laut TargetScan *target-sites* der viralen miRNAs besitzen, sind für beide Zelllinien identisch. Aus Tabelle 7 geht hervor, dass bei MLE-12 von den 590 hochregulierten Genen 70 eine vorhergesagte Erkennungssequenz für virale miRNAs aufweisen. Für die B-Zelllinie Ag8 sind es bei 484 hochregulierten Genen 46 Gene, die als direktes *target* in Betracht kommen. Die graphische Darstellung in einem Venn-Diagramm gibt einen Überblick der Tabellendaten (siehe Abbildung 30). Als interessant zu erwähnen gilt, dass zwischen den Zelllinien keine Gemeinsamkeiten in der Regulation durch virale miRNAs bestehen. Dies könnte auf eine zell- und lebenszyklusspezifische Funktion der viralen miRNAs hinweisen, oder durch falsch-negative Kandidaten auf Grund der gewählten

Ausschlusskriterien erklärt werden.

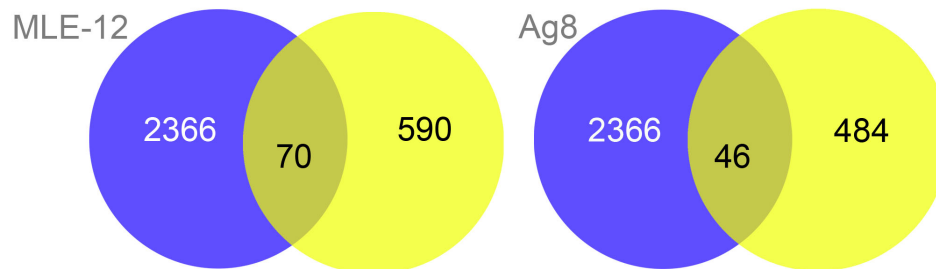


Abbildung 30: Kombination der bioinformatischen Vorhersage der Bindewahrscheinlichkeit der *seed*-Sequenz an zelluläre Gene mit den signifikant hochregulierten Genen nach Infektion der Zelllinien MLE-12 und Ag8 mit Wildtyp MHV-68 und $\Delta 1-9$.

8.3.1 Alveoläre Epithelzelllinie - MLE-12

In den alveolären Epithelzellen MLE-12, die als Modell für die lytische Replikation im Lebenszyklus von MHV-68 verwendet wurden, konnten 70 Gene ermittelt werden. Diese besitzen eine vorhergesagte Bindestelle für eine oder mehrere virale miRNAs und zeigten eine Erhöhung ihrer Expression nach Infektion mit der Mutante $\Delta 1-9$. Eine Analyse der Ontologien (GO, *gene ontologies*) mittels des Webtools DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) erlaubte eine Einteilung nach molekularen Funktionen und biologischen Prozessen [Huang et al., 2009]. In der Tabelle wurden nur die ersten fünf Ränge der jeweiligen Analyse aufgeführt (siehe Tabelle 8). Die wichtigste molekulare Funktion ist dabei die *Proteindimerisierung*, während der wichtigste biologische Prozess die *Regulation der Transkription* beinhaltet.

Die Zuordnung der viralen miRNAs zu den einzelnen Genen der 70 Treffer ermöglichte die prozentuale Darstellung der Häufigkeit von Bindestellen für die jeweilige virale miRNA an der Gesamtzahl der *targets* (siehe Abbildung 31). Auch hier lag die prozentuale Häufigkeit der miRNAs mghv-mir-M1-1 und mghv-mir-M1-9 deutlich über der der anderen miRNAs (vgl. zu Abbildung 29 A).

Molekulare Funktion			
Bezeichnung	Anzahl der Gene	Anteil in %	<i>P-Value</i>
<i>protein dimerization activity</i>	5	0,7	3,4e-2
<i>ubiquitin-protein ligase activity</i>	3	0,4	5,4e-2
<i>phospholipid-translocating ATPase activity</i>	2	0,3	5,6e-2
<i>aminophospholipid transporter activity</i>	2	0,3	7,0e-2
<i>protein heterodimerization activity</i>	3	0,4	7,1e-2
Biologische Prozesse			
Bezeichnung	Anzahl der Gene	Anteil in %	<i>P-Value</i>
<i>regulation of transcription</i>	14	2,0	7,3e-2
<i>proteolysis</i>	8	1,1	9,8e-2
<i>modification-dependent macromolecule catabolic process</i>	6	0,8	4,4e-2
<i>proteolysis involved in cellular protein catabolic process</i>	6	0,8	5,3e-2
<i>cellular protein catabolic process</i>	6	0,8	5,4e-2

Tabelle 8: GO-Analyse der molekularen Funktion und der biologischen Prozesse der 70 Treffer bei MLE-12. Gezeigt sind jeweils die Ränge 1 bis 5. Die molekularen Funktionen sind nach *p-value* sortiert, während die biologischen Prozesse nach der Häufigkeit geordnet sind.

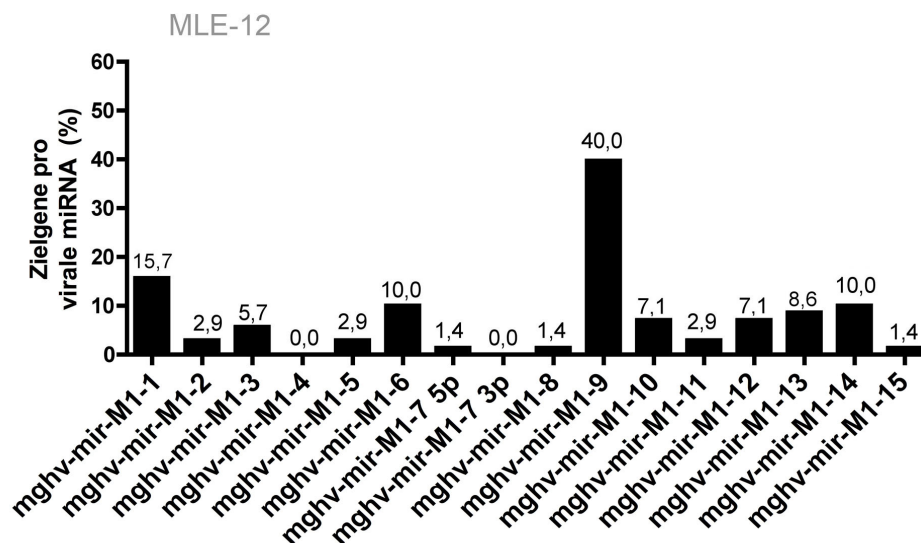


Abbildung 31: Zuordnung der 70 Treffer in MLE-12 auf die einzelnen viralen miRNAs auf Grund der ihnen vorhergesagten miRNA Bindestellen.

8.3.2 B-Zelllinie - Ag8

Für die murine B-Zelllinie Ag8, welche als Modell für das natürliche Latenzreservoir von MHV-68 verwendet wurde, ergaben sich 46 Gene als mögliche *targets*. Bei den GO-Analysen zeigte sich im Vergleich zu MLE-12 bei der molekularen Funktion ein sehr unterschiedliches Bild, während bei den biologischen Prozessen ebenfalls die *Regulation der Transkription* von Bedeutung ist (siehe Tabelle 9). Interessant ist, dass auf Grund der

Gene *Crebbp*, *Jak1* und *Sos1* ein Signalweg (JAK/STAT) als Ziel der Regulation durch virale miRNAs bei einer KEGG-Analyse angezeigt wurde. Die Aufgliederung der Zielgene auf die jeweilige vorhergesagte miRNA führte zur Darstellung der Häufigkeit des Auftretens einer viralen miRNA-Bindestelle in den 46 möglichen Zielgenen in Prozent (siehe Abbildung 32).

Molekulare Funktion			
Bezeichnung	Anzahl der Gene	Anteil in %	<i>P-Value</i>
<i>DNA binding</i>	15	3,4	1,2e-4
<i>transcription regulator activity</i>	12	2,7	2,3e-4
<i>protein kinase activity</i>	8	1,8	8,3e-4
<i>protein serine/threonine kinase activity</i>	7	1,6	8,5e-4
<i>ATP binding</i>	10	2,2	1,3e-2
Biologische Prozesse			
Bezeichnung	Anzahl der Gene	Anteil in %	<i>P-Value</i>
<i>transcription</i>	15	3,4	8,9e-5
<i>regulation of transcription</i>	15	3,4	1,0e-3
<i>regulation of transcription, DNA-dependent</i>	13	2,9	2,5e-4
<i>regulation of RNA metabolic process</i>	13	2,9	2,9e-4
<i>protein amino acid phosphorylation</i>	9	2,0	2,2e-4

Tabelle 9: GO-Analyse der molekularen Funktion der 46 Treffer bei Ag8. Gezeigt sind die Ränge 1 bis 5. Die molekularen Funktionen sind nach *p-value* sortiert, während die biologischen Prozesse nach der Häufigkeit geordnet sind.

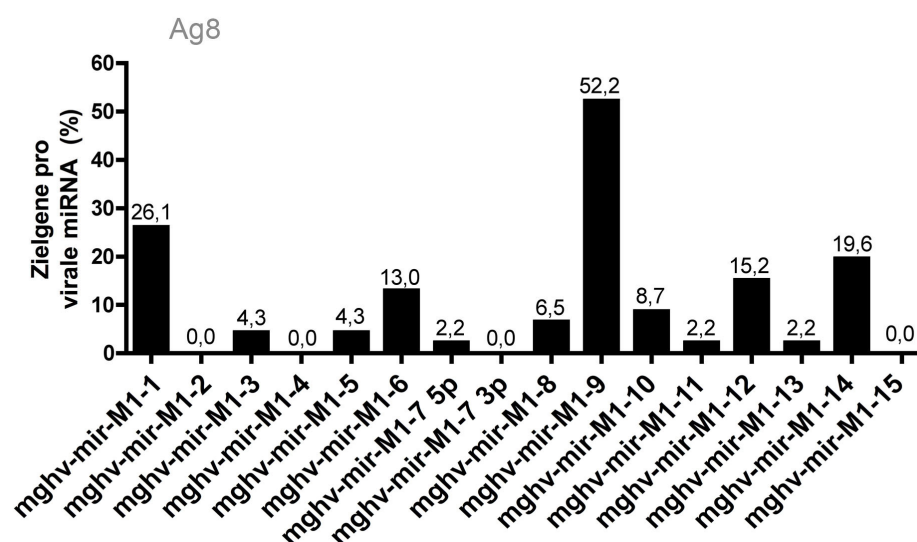


Abbildung 32: Zuordnung der 46 Treffer in Ag8 auf die einzelnen viralen miRNAs auf Grund der ihnen vorhergesagten miRNA Bindestellen.

8.4 Weitere experimentelle Ansätze zur *target*-Identifizierung viraler miRNAs

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse aus den bioinformatischen Vorhersagen in Kombination mit der *in vitro* Infektion von Zelllinien können weitere experimentelle Vorgehensweisen verwendet werden (siehe Kapitel 2.2.5, Seite 24). Im Folgenden wurden zwei Methoden für die Identifizierung von viralen *targets* angewendet. RIP-CHIP ist dabei die gezielte Immunopräzipitation von Argonaut-Proteinen (AGO2), welche im RISC auch die mRNA der Zielsequenz aufweisen. Durch Analyse mittels Mikroarray werden mRNAs, die in der spezifischen Fraktion angereichert sind, sichtbar. Bei der Verwendung von *Nanostring* (*n-counter* Technologie) wird die RNA nach der AGO2-Immunopräzipitation auf eine gezielte Auswahl an Genen untersucht. Dafür muss im Vorfeld dieses *set* an Genen ausgewählt werden, was somit die Analyse auf eine begrenzte Anzahl an Genen einschränkt.

8.4.1 RIP-CHIP

Über die AGO2-IP werden die mRNAs der Zielsequenzen im Vergleich zu einer unspezifischen IP angereichert (siehe Kapitel 5.5.1, Seite 51) und können mittels einer nachgeschalteten Mikroarray-Analyse aufgezeigt werden. Dazu wurden repräsentativ für die lytische Replikation die alveolären Epithelzellen MLE-12 mit Wildtyp MHV-68 infiziert und gegen eine nicht-infizierte Kontrolle verglichen. Für die persistente Infektion wurde die B-Zelllinie S11 mit der nicht-infizierten B-Zelllinie Ag8 verglichen. Die Durchführung sah vor, dass jeweils die spezifische (AGO2) und unspezifische (BrdU) IP der Proben im Triplikat angefertigt und durch Mikroarray analysiert werden sollte. Nach zahlreichen Versuchen und internen Qualitätskontrollen der RNA nach der IP (siehe Kapitel 5.2.8, Seite 43) konnte lediglich eine Probe der B-Zelllinie S11 erfolgreich auf einer Mikroarray-Plattform prozessiert und analysiert werden. Daraus gingen 718 Gene mit einer Anreicherung zwischen der spezifischen und unspezifischen IP (AGO2/BrdU) größer als zweifach ($\geq 2x$) hervor (siehe Abbildung 33). Von den 718 Genen wiesen 87 eine durch TargetScan vorhergesagte miRNA-Bindestelle auf. Der Abgleich zu den 484 aus den im Ag8 Array-Experiment hochregulierten Genen mit einem *cut-off* Wert über 1,25x brachte 30 Gene hervor. Durch Kombination der Daten aus Bioinformatik und Mikroarray konnte die Zahl von 46 möglichen Kandidaten bei Ag8 (siehe Kapitel 8.3.2) mit der Schnittmenge aus dem RIP-CHIP Ansatz bei S11 für murine B-Zellen weiter eingegrenzt und auf drei Treffer reduziert werden.

Wie bereits in Kapitel 8.2 angeführt, wurden die *cut-off* Werte bei der Mikroarray-

Analyse willkürlich festgelegt und bereits sehr sensitiv angesetzt. Da über die Kombination durch die drei verschiedenen Ansätze nur drei Gene identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob das willkürlich festgelegte Ausschlusskriterium mit $\geq 1,25$ beim Ag8 Array bereits zu stringent gewählt war. Durch eine nachstehende Validierung der Zielgene (z.B. RT-PCR oder *Nanostring*) könnte durch Veränderung der *cut-off* Werte der Einfluss dieses willkürlich festgelegten Ausschlusskriteriums überprüft werden. Bei einer Auswahl von zu stringenten Ausschlusskriterien wird die Zahl der falsch-negativen drastisch erhöht. Die Befürchtung, dass bei eher sensitiven Ausschlusskriterien aber auch zahllose falsch-positive Kandidaten ausgewählt würden, konnte selbst bei der Reduktion des *cut-off* Werts auf $\geq 1,04$ nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 33). Die Zahl der Treffer durch alle drei Identifizierungsmethoden erhöhte sich lediglich auf 20 Gene (siehe Tabelle 10). Die Werte aus dem Ag8 Mikroarray-Experiment für die 20 möglichen Zielgene lagen dabei durchschnittlich bei einem 16%-igen Unterschied, was somit 12% über dem gewählten *cut-off* Wert von 1,04x liegt. Lediglich ein Gen (*Nadk*) befand sich beim tatsächlich gewählten *cut-off* Wert von 4%. Von den Genen, die dem JAK/STAT-Signalweg zugeordnet werden konnten (siehe Kapitel 8.3.2, Seite 89), fand sich unter den 20 Treffern lediglich *Jak1*.

Da, wie bereits oben erwähnt, die 718 Gene wie auch die 20 Treffer nur aus einer S11 AGO2/BrdU Auswertung stammen, war eine Validierung über eine andere Methode von großer Bedeutung. Darüber hinaus sollten die Daten eines Mikroarray Experiments stets durch eine unabhängige Methode wie z.B. RT-PCR, bestätigt werden. Die *Nanostring* Methode stellt eine gleichwertige Alternative zur RT-PCR dar, weshalb die AGO2-IP Proben mittels dieser Technologie analysiert wurden.



Abbildung 33: Kombination der Ergebnislisten aus bioinformatischer Vorhersage (blau), *in vitro* Infektion von Ag8 Zellen mit Wildtyp MHV-68 und $\Delta 1-9$ (gelb) und den mehr als 2fach regulierten Genen nach Mikroarray-Analyse eines RIP-CHIP Experiments der persistently infizierten B-Zelllinie S11 (rot), dargestellt in einem Venn-Diagramm. Links ist die Auflistung der Anzahl der Treffer bei einem *cut-off* Wert der Ag8 Mikroarray-Analyse von $\geq 1,25$. Es ergeben sich drei Treffer aus der Kombination der drei Identifizierungsmethoden von *targets*. Rechts ist die Anzahl der Treffer auf 20 erhöht, indem der *cut-off* Wert der Ag8 Mikroarray-Analyse auf $\geq 1,04$ reduziert wurde.

Genname	Gensymbol	Ag8 Array Quotient $\Delta 1-9/WT$	Anreicherung AGO2/BrdU	Dublette
ATPase H ⁺ transporting lysosomal V1 subunit E1	Atp6v1e1	1,13	4,24	-
Ribosomal protein S19 binding protein 1	Rps19bp1	1,08	3,00	-
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2	Gng2	1,08	3,00	-
Chromodomain helicase DNA binding protein 7	Chd7	1,09	2,59	-
Clathrin interactor 1	Clint1	1,11	2,53	-
Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	Whsc1	1,09	2,36	-
RAB8A, member RAS oncogene family	Rab8a	1,16	2,21	-
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	Dgat2	1,15	2,18	-
Casitas B-lineage lymphoma	Cbl	1,09	2,15	-
Kinesin family member 20A	Kif20a	1,38	2,13	-
Interferon regulatory factor 2	Irf2	1,16	2,13	-
Forkhead box K1	Foxk1	1,24	2,13	2x
CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	Cnot2	1,07	2,08	2x
Solute carrier family 38, member 1	Slc38a1	1,17	2,08	3x
Coronin, actin binding protein 1C	Coro1c	1,19	2,07	-
Ubiquitin specific peptidase 7	Usp7	1,31	2,05	2x
Torsin family 1, member B	Tor1b	1,18	2,04	-
NAD kinase	Nadk	1,04	2,03	-
Janus kinase 1	Jak1	1,28	2,02	-
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	Dnaja2	1,22	2,01	3x

Tabelle 10: Die 20 *matches* der Kombination von bioinformatischer Vorhersage und *in vitro* Infektion von Ag8 mit Wildtyp und $\Delta 1-9$ (*cut-off* Wert $\geq 1,04x$) mit dem experimentellen Ansatz der AGO2-IP durch RIP-CHIP in S11 Zellen im Unikat. Die Zahl der Dubletten gibt die Anzahl vorhergesagter *target sites* für MHV-68 miRNAs in der 3'-UTR des Gens an. Der Quotient $\Delta 1-9/WT$ aus dem Ag8 Array zeigt die *cut-off* Werte für die einzelnen Gene.

8.4.2 *Nanostring*

Für die Durchführung der *target*-Identifizierung mittels *Nanostring* wurden RNA-Proben, wie für die RIP-CHIP Experimente, aus einer AGO2-IP, unspezifischen BrdU-IP und Gesamt-RNA verwendet. Dazu wurden WT infizierte mit nicht-infizierten MLE-12 Zellen, und die persistent infizierten B-Zellen S11 mit nicht-infizierten Ag8, verglichen.

Bei der *Nanostring n-counter* Technologie kann nur eine begrenzte und ausgewählte Anzahl an Genen untersucht werden. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wurde durch die Kombination der verschiedenen Methoden eine Auswahl von 100 Genen getroffen (siehe Abbildung 34). Aus den jeweiligen Treffern der Kombination von Bioinformatik und Mikroarray-Analyse bei MLE-12 und Ag8 wurden die ersten 30 bzw. 29 Ränge in Abhängigkeit des *cut-off* Werts der Mikroarray-Analyse in die *Nanostring* Analyse einbezogen. Aus dem RIP-CHIP Unikat wurden die ersten 25 Plätze der 718 Gene ausgewählt. Diese ersten 25 Ränge weisen einen Anreicherung von AGO2/BrdU von mehr als 3,5x auf, was in Anlehnung an Werte aus der Literatur einem sehr stringenten Auswahlkriterium entspricht [Dölken et al., 2010]. Die 20 *matches* aus allen drei Ansätzen zur Identifizierung von miRNA *targets* (siehe Tabelle 10) wurden vollständig zu den 100 Genen für die *Nanostring* Untersuchung hinzugefügt. Die Analyse wurde pro Zelllinie und IP jeweils im Duplikat durchgeführt.

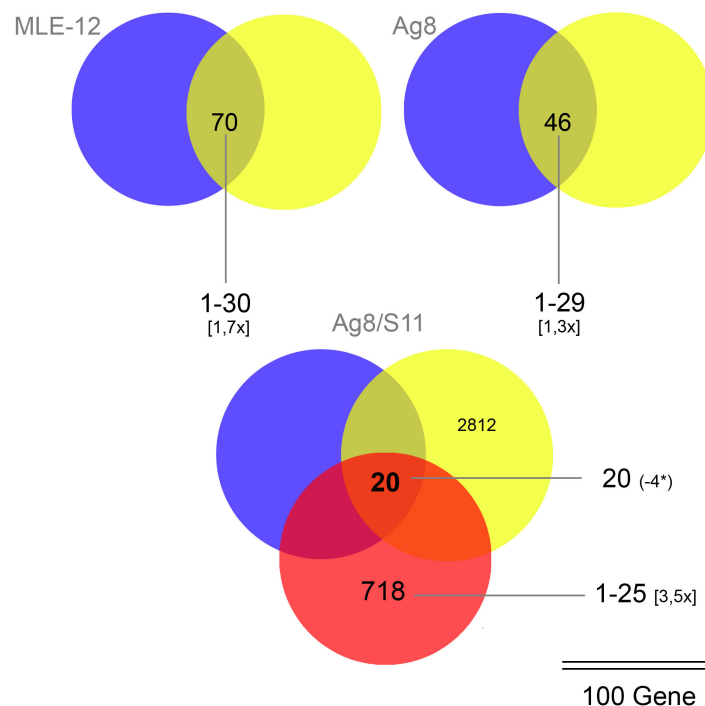


Abbildung 34: Auswahlkriterien und Aufschlüsselung der 100 ausgewählten Gene für die Untersuchung der AGO-IP Proben durch *Nanostring* (*n-counter* Technologie). 30 Gene aus der Intersektion MLE-12 Array und TargetScan, 29 Gene aus der Intersektion Ag8 Array und TargetScan, 25 Gene aus dem S11 RIP-CHIP Experiment und 20 Gene aus der Intersektion von S11 RIP-CHIP, Ag8 Array und TargetScan. *) Vier der 20 *matches* befinden sich bereits in einer der anderen Auswahlfraktionen.

Die *Nanostring* Ergebnisse der Proben aus den beiden Zellsystemen MLE-12 (infiziert/nicht-infiziert) und S11/Ag8 wurden normalisiert und durch Anlegen eines *cut-off* Wertes von 1,2-facher Anreicherung zwischen spezifischer AGO2-IP und unspezifischer BrdU-IP ausgewertet. In MLE-12 waren sechs Gene der 100 mehr als 1,2-fach angereichert, und nur drei davon besitzen eine vorhergesagte miRNA-Bindestelle. Lediglich ein Gen davon wies auch bei der Mikroarray-Analyse eine signifikante Hochregulation auf. Zu den 70 möglichen direkten Treffern gab es keine Treffer (siehe Abbildung 35, links). In den Zellen S11/Ag8 waren 29 Gene der 100 mehr als 1,2-fach angereichert. Von diesen haben 20 eine vorhergesagte *target-site* und 18 stimmen mit den signifikant hochregulierten Genen aus dem Mikroarray Experiment von Ag8 überein. Von den 46 möglichen direkten Kandidaten ergeben sich damit 14 Gene als Schnittmenge aus drei unabhängigen miRNA *target*-Identifizierungsmethoden (siehe Abbildung 35, rechts). Zu berücksichtigen ist dabei, dass die Validierung der Kandidaten durch die Eingrenzung auf 100 Gene eingeschränkt ist. Durch Anlegen weniger stringenter Ausschlusskriterien und Erhöhung der Anzahl der zu untersuchenden Gene würde die Zahl der Kandidaten in beiden Zelllinien steigen.

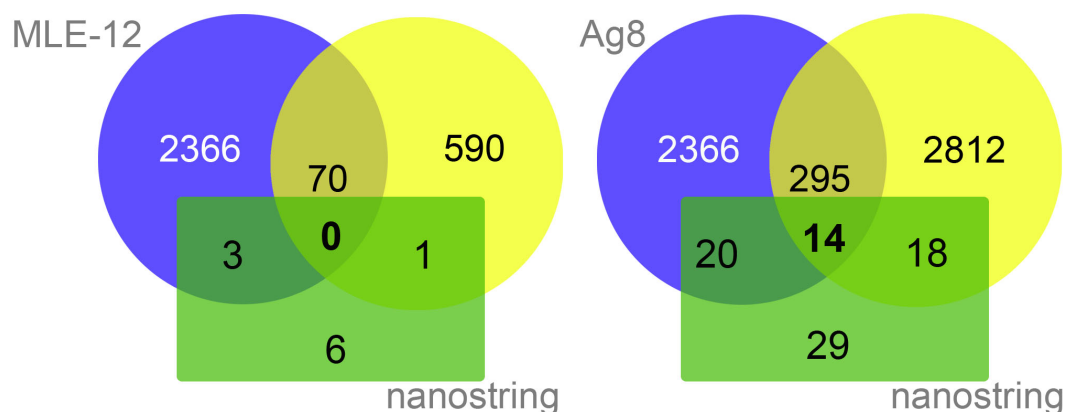


Abbildung 35: Die Intersektionen der Ergebnisse aus der Nanostring Analyse. Bei MLE-12 befinden sechs Gene oberhalb des Ausschlusswerts einer 1,2-fachen Anreicherung von AGO2-IP gegenüber BrdU-IP. Von diesen ist ein Gen aus dem Array bekannt, und drei besitzen eine vorhergesagte Bindestelle für eine virale miRNA von MHV-68. Kein Gen entsprach den stringenten Ausschlusskriterien und konnte in der Kombination der Ansätze der Schnittmenge zugewiesen werden. In Ag8 sind 29 Gene oberhalb des *cut-off* Wertes von 1,2. Von diesen sind 18 Gene auch in der Array-Analyse gefunden worden, und 20 besitzen eine *target-site*. 14 Gene entsprachen den stringenten Ausschlusskriterien und wurden als Intersektion aus den drei verschiedenen Ansätzen zur miRNA *target*-Identifizierung gewonnen. Zu berücksichtigen ist, dass die Analyse sich lediglich auf 100 ausgewählte Gene beschränkt.

8.5 Zusammenfassung der Gene in potentielle Zielgenkandidaten

Nach Kombination aller *target*-Identifizierungs-Experimente konnten letztlich 14 Gene mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Zielstruktur für die viralen miRNAs von MHV-68 benannt werden (siehe Tabelle 11). Von den 20 aus dem einzelnen RIP-CHIP Experiment stammenden Kandidaten konnten sechs über die *Nanostring* Technologie bestätigt werden. Damit sind diese für B-Zellen ungleich den anderen nicht durch drei, sondern durch vier unabhängige Methoden zur *target*-Identifizierung validiert worden. Eine GO-Analyse der 14 Kandidaten führte bei den molekularen Funktionen zu einer Überrepräsentierung der *Ribonukleotid Bindung* (5 Kandidaten; $p\text{-value } 3,6^{-2}$) und bei den biologischen Prozessen zur *negativen Regulation des Zellzyklus* (2 Kandidaten; $p\text{-value } 3,4^{-2}$). Eine Kurzbeschreibung der Kandidaten befindet sich im Anhang (siehe Seite 126).

Genname	Gensymbol	S11 AGO/BrdU	Ag8 AGO/BrdU	Validierung d. T/A/R/N	Dublette
Mitochondrial tumor suppressor 1	Mtus1	2,37	0,29	T/A/-/N	-
Lysophosphatidic acid receptor 1	Lpar1	2,00	1,01	T/A/-/N	-
Calmodulin binding transcription activator 1	Camta1	1,78	0,46	T/A/-/N	-
Hexamethylene bis-acetamide inducible 1	Hexim1	1,47	0,26	T/A/-/N	2x
Nicotinamide nucleotide adenylyl-transferase 2	Nmnat2	1,45	0,70	T/A/-/N	-
Torsin family 1, member B	Tor1b	1,37	0,36	T/A/R/N	-
Forkhead box K1	Foxk1	1,27	0,38	T/A/R/N	2x
Kinase suppressor of ras 1	Ksr1	1,25	0,52	T/A/-/N	-
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit E1*	Atp6v1e1	1,24	0,45	T/A/R/N	-
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	Dgat2	1,23	0,51	T/A/R/N	-
RAB8A, member RAS oncogene family	Rab8a	1,23	0,49	T/A/R/N	-
Neurexin III	Nrxn3	1,23	0,52	T/A/-/N	-
Ribosomal protein S19 binding protein 1	Rps19bp1	1,22	0,65	T/A/R/N	-
PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Pif1	1,22	0,37	T/A/-/N	-

Tabelle 11: Die 14 potentiellen Zielgenkandidaten, bestätigt durch die Kombination der vier Methoden, bioinformatische Vorhersage (T), Genexpressionsanalyse durch Mikroarray (A), RIP-CHIP (R) und *Nanostring* (N) zur Identifizierung von MHV-68 miRNA *targets*. *) Innerhalb der ersten 25 Ränge der 718 RIP-CHIP Kandidaten.

8.6 Funktionale Validierung der Zielgene durch Luciferase-Assay

Zur Validierung der Fähigkeit einer miRNA, eine Zielsequenz translational zu inhibieren, ist die Durchführung eines Luciferase-Assays notwendig. Aus den 14 in Tabelle 11 aufgeführten Kandidaten konnte auf Grund der zeitlichen Begrenzung im Rahmen dieser Arbeit keines auf seine Funktion untersucht werden. Die Etablierung des Assays wurde jedoch anhand eines in der Literatur bereits beschriebenen *targets* durchgeführt. Dazu wurde die 3'-UTR von humanem IPO7 (Importin 7) in psiCHECK-2 als Zielsequenz von ebv-mir-BART-3 in pSG5 verwendet [Dölken et al., 2010, Skalsky et al., 2012]. Die Plasmide wurden freundlicherweise von F. Grässer zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 5.3.4, Seite 48). Die Kotransfektion des Plasmids mit der IPO7 Zielsequenz mit einem leeren pSG (pSG leer) wurde als 100% gesetzt. Durch die Anwesenheit der BART miRNAs reduzierte sich die Emission an Licht signifikant ($p\text{-value} < 0,001$, ungepaarter t-Test) auf ca. 60% (siehe Abbildung 36). Die IPO7 3'-UTRs mit Mutationen in der Bindestelle für die miRNA (IPO7 mut5 und IPO7 D6) dienten bei der Durchführung als Negativ-Kontrolle und zeigten keine miRNA spezifische Inhibition der Luciferaseexpression bei Anwesenheit der BART miRNAs. Dies entsprach den bereits veröffentlichten Ergebnissen für diese miRNA:mRNA-Interaktion [Dölken et al., 2010].

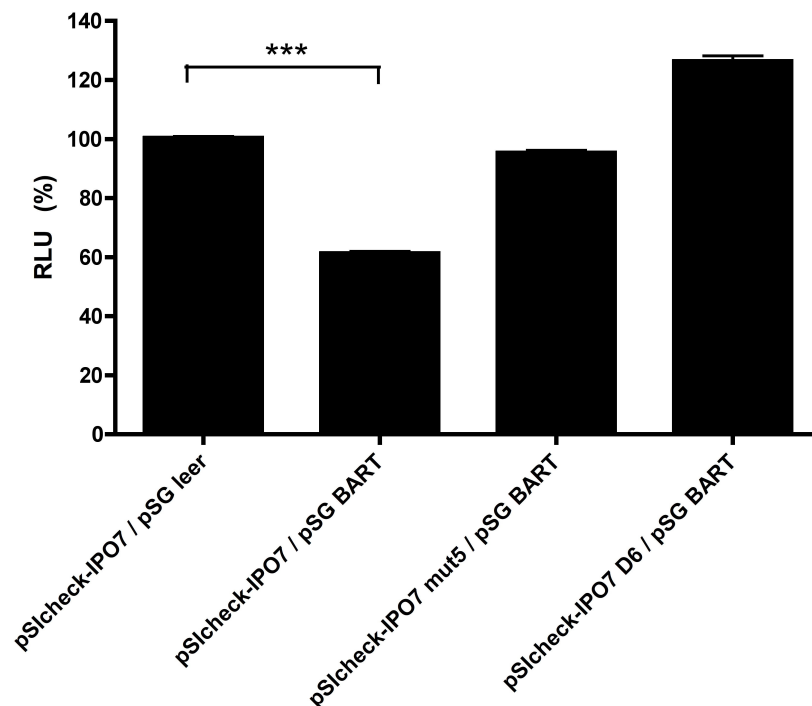


Abbildung 36: Luciferase-Assay mit dem humanen Gen IPO7 im Luciferase Plasmid psiCHECK-2 in humanen HEK293 Zellen. In Abwesenheit der BART 1-5 (pSG *leer*) miRNAs von EBV findet keine Inhibition der Luciferaseexpression statt. Bei Kotransfektion mit pSG BART1-5 ist die Intensität des Lichtsignals um 40% signifikant reduziert ($p\text{-value} < 0,001$, ungepaarter t-Test). Die 3'-UTRs bei IPO7 mut5 und IPO7 D6 sind in der Erkennungssequenz für ebv-mir-BART-3 mutiert bzw. deletiert worden, und führen in Anwesenheit der BART miRNAs zu keiner nachweisbaren Beeinflussung der Lichtintensität. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment gemessen im Triplikat \pm SD.

8.7 Zusammenfassung der Identifizierung von *targets* der miRNAs von MHV-68

Durch die Kombination verschiedener Methoden zur *target*-Identifizierung viraler miRNAs, wie bioinformatische Vorhersage durch TargetScan, Mikroarray-Analyse der Genexpression nach Infektion mit Mutante und Wildtyp, RIP-CHIP Mikroarray-Analyse und *Nanostring* Analyse nach Argonaut-IP konnten mögliche Zielgene gezeigt werden. Dazu wurden für die beiden Abschnitte des Lebenszyklus von MHV-68 die repräsentativen Zelllinien MLE-12 und S11/Ag8 verwendet. Die Zahl der in Frage kommenden Kandidaten konnte letztlich auf 14 potentielle Zielgene reduziert werden.

9 Ausblick und weitere Experimente

Da die 14 identifizierten Zielgenkandidaten der miRNAs von MHV-68 im Rahmen dieser Arbeit nicht in einem Luciferase-Assay untersucht werden konnten, ist der nächste Schritt die Klonierung der 3'-UTRs dieser Kandidaten in den Vektor psiCHECK-2. Die Plasmide zur Kotransfektion mit den viralen miRNAs sind bereits von der Herstellung der miRNA *knock-out* Mutante Δ 1-9 und deren Revertante vorhanden. Darüber hinaus könnte durch die Anwendung einer weiteren Hochdurchsatz-Methode wie PAR-CLIP das Targetom der persistent infizierten B-Zelllinie S11 analysiert und mit den hier erarbeiteten Kandidatenlisten abgeglichen werden. Dadurch wäre eine Validierung der verschiedenen Ansätze möglich.

Für die Durchführung von *in vivo* Versuchen soll ein rekombinantes MHV-68 hergestellt werden, dem alle bekannten (15) miRNAs fehlen. Die in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Zielgene der MHV-68 miRNAs können die Suche nach Phänotypen von miRNA-Deletionsmutanten von MHV-68 erleichtern.

Teil IV

Diskussion

10 Hochdurchsatz-Sequenzierung und Identifizierung von neuen MHV-68 miRNAs

10.1 Identifizierung neuer miRNAs von MHV-68

Die Klasse der genregulatorisch aktiven kleinen RNAs kommt in Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen vor. Ihre Identifizierung in Viren führte zu einem weiteren Aspekt in der Virus/Wirt-Interaktion [Pfeffer et al., 2004]. Die damals neun in MHV-68 identifizierten miRNAs wurden durch Klonierung der sRNAs aus S11 gefunden [Pfeffer et al., 2005]. In anderen Viren wurden miRNAs durch Anwendung und Kombination verschiedener Technologien wie computer-basierter Vorhersage und Mikroarray-Technologie gefunden [Grundhoff et al., 2006]. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit hatte die damals neu etablierte Technologie der Hochdurchsatz-Sequenzierung ihre Leistungsfähigkeit durch die Erzeugung eines miRNA-Expressionsatlas für Säugetiere bewiesen [Landgraf et al., 2007]. Die ersten Studien über die Anwendung der neuen Methode zur Identifizierung und Bestätigung viraler miRNAs folgten in kurzer Zeit [Morgan et al., 2008, Tang et al., 2009, Zhu et al., 2009]. Die Methode implizierte einen umfassenden und erschöpfenden Ansatz zur Identifizierung neuer viraler und zellulärer miRNAs.

Da für die neun damals bekannten miRNAs noch keine biologischen Funktionen beschrieben waren, und die funktionale Aufklärung der miRNAs von MHV-68 wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit sein sollte, musste zuerst das miRNA Kodierungspotential von MHV-68 analysiert werden. Da aus einigen Primärtranskripten der damals neun bekannten miRNAs von MHV-68 scheinbar nur eine mature miRNA hervorging, obwohl zwei *hairpin-loops* gebildet werden (siehe Abbildung 9, Seite 23), bestand die Möglichkeit, dass weitere, bislang unbekannte miRNAs von MHV-68 existieren.

Es wurden Bibliotheken der sRNA Fraktionen aus S11 und TPA-induzierten S11 sowie infizierten und nicht-infizierten NIH3T3 zur Hochdurchsatz-Sequenzierung erzeugt. Durch Anwendung der in Kapitel 2.2.4 angesprochenen Kriterien zur Identifizierung von miRNAs durch Hochdurchsatz-Sequenzierung [Cullen, 2011] konnten sechs neue miRNA Vorläuferstrukturen von MHV-68 identifiziert werden. Die miRNA Kandidaten zeigten teilweise eine signifikant erhöhte *read*-Anzahl und konnten distinkten Orten auf dem Genom von MHV-68 zugeordnet werden. Die Sequenzen, die anderen nicht-kodierenden

RNAs (ncRNA) zugeordnet werden konnten und Sequenzen mit nicht eindeutiger Länge und definierten Startnukleotiden wurden als ncRNA bezeichnet und nicht näher analysiert. Die miRNAs mghv-mir-M1-11 und mghv-mir-M1-15 wurden trotz ihrer geringen *read* Zahlen als Kandidaten betrachtet, da ihre Sekundärstruktur sowie ihr Genlokus sich in die Rahmenbedingungen einer miRNA von MHV-68 einfügt.

In weiteren Validierungsexperimenten wie *Northernblot* und RT-PCR konnten die meisten Kandidaten als mature und funktionale miRNAs bestätigt werden. Unabhängig davon identifizierte und charakterisierte eine andere Arbeitsgruppe zur gleichen Zeit die selben sechs miRNA Kandidaten in MHV-68, jedoch ebenfalls keine weiteren [Reese et al., 2010]. Dies legt nahe, dass das miRNA-Kodierungspotential von MHV-68 mit dieser Arbeit vollständig beschrieben wurde. Damit kann der Einfluss von miRNAs auf die Infektion und Pathogenese von MHV-68 als Modell für die humanpathogenen Gammaherpesviren EBV und KSHV umfassend untersucht, sowie Zielgene und funktionale Homologe der miRNAs von MHV-68 identifiziert, werden.

10.2 Lokalisation, Transkription und Prozessierung der neuen miRNAs im Genom von MHV-68

Nach der Zuordnung der Sequenzen der sechs neu gefundenen miRNA-Vorläufer konnten diese in direkter räumlicher Nähe zu den neun bereits publizierten miRNAs von MHV-68 angeordnet werden (siehe Abbildung 18, Seite 61). Darüber hinaus fügen sie sich in die MHV-68 typische Primärstruktur einer viralen tRNA mit einer oder zwei miRNAs (vtRNA-miRNA-miRNA) mit einer Länge von ca. 200 nt ein. In anderen Organismen ist bisher noch nicht beschrieben worden, dass zwei unabhängige miRNAs nur durch wenige Nukleotide getrennt voneinander vorliegen. Die miRNAs von MHV-68 befinden sich innerhalb der ersten 6 kbp am linken Genomende und werden durch RNA-Polymerase III A/B-Promotor getriebene Transkription erzeugt [Bogerd et al., 2010, Diebel et al., 2010].

Die Transkription der viralen miRNAs über RNA-Polymerase III ist im Vergleich zu einer RNA-Polymerase II getriebenen Transkription weniger von der Wirtszelle reguliert. Über RNA-Polymerase III werden wichtige zelluläre *housekeeping* Transkripte wie rRNAs, tRNAs und andere ncRNAs für Zellwachstum und Zellzyklusregulation bereitgestellt. In der zellulären Regulation von kleinen inhibitorischen RNAs sind neben der Transkriptionskontrolle durch die RNA-Polymerase aber viele weitere Schaltunkte bekannt [Siomi and Siomi, 2010]. Nahezu jedes Enzym der kanonischen Prozessierung erlaubt es der Zelle, Einfluss auf die Menge an maturer miRNA zu nehmen.

Das vtRNA-miRNA-miRNA Primärtranskript besitzt die typische tRNA-Kleeblattstruktur (siehe Abbildung 18, Seite 61) und ist damit Substrat für das Enzym tRNaseZ, welches grundsätzlich zur Prozessierung von tRNAs beiträgt [Bogerd et al., 2010, Späth et al., 2007, Vogel et al., 2005]. Der initiale Schritt in der miRNA Biogenese erfolgt dadurch für miRNAs von MHV-68 nicht über Drosha. Die resultierende pre-miRNA wird im Anschluss jedoch durch die üblichen Enzyme der kanonischen Prozessierung zur maturen miRNA. Dies hatte Bogerd et al. [2010] durch einen siRNA *knock-down* von Dicer in HEK293 Zellen gezeigt, und wurde in der vorliegenden Arbeit in einem physiologischeren Kontext durch Infektion von Dicer -/- MEFs bestätigt (siehe Abbildung 19, Seite 63). Damit umgeht MHV-68 zwei Regulationspunkte der Wirtszelle in der Biogenese seiner miRNAs: Transkription und initiale Prozessierung.

Die grundsätzliche Verwendung von tRNA Promotoren zur Herstellung von sRNAs (miRNAs oder ncRNAs) konnte bei Menschen und Mäusen gleichermaßen gezeigt werden [Haussecker et al., 2010, Reese et al., 2010]. Die nähere Funktion der vtRNAs ist dabei aber bislang noch nicht aufgeklärt worden. Nach ihrer Entdeckung durch Bowden et al. [1997] und der Beschreibung als Nachweismethode der Latenz konnte ihre hohe Expression in latent mit MHV-68 infizierten Mäusen in sekundärem lymphoiden Gewebe (*germinal centers*) *in vivo* nachgewiesen werden [Simas et al., 1998]. *In vitro* Mikroarray-Analysen zeigten ihre permanente Expression über die jeweiligen Phasen während der akuten lytischen Replikation (IE, E und L) [Ebrahimi et al., 2003, Martinez-Guzman et al., 2003]. Darüber hinaus fand man die vtRNAs in MHV-68 Virionen, und konnte eine zufällige Verpackung auf Grund eines anderen, nicht abundanten MHV-68 Transkripts (M11) ausschließen [Cliffe et al., 2009]. Zwar besitzen die acht vtRNAs untereinander ca. 75% Sequenzhomologie [Cliffe et al., 2009], scheinen aber kein spezifisches und funktional notwendiges Sequenzmuster aufzuweisen, da sie durch zelluläre oder andere tRNA-Sequenzen ausgetauscht werden können, ohne dass die Biogenese der maturen miRNAs von MHV-68 beeinträchtigt wird [Bogerd et al., 2010].

10.3 Expressionsmuster der viralen miRNAs

Die *read*-Anzahl aus Tabelle 4 (siehe Seite 59) gibt das relative Vorkommen der einzelnen viralen miRNAs in den jeweiligen Zelllinien wieder (NIH3T3 und S11). Es sollte die Expression der viralen miRNAs in beiden Zuständen des viralen Lebenszyklus analysiert werden. Dazu wurde die Fibroblastenzelllinie NIH3T3 durch eine Wildtyp MHV-68 Infektion für 48 Stunden als Modell für die lytische Replikation eingesetzt. Die B-Zelllinie S11 hingegen entspricht durch ihre persistente Infektion mit Wildtyp MHV-68 dem Latenz-

modell. Die TPA-Induktion von S11 sollte die miRNAs, die gegebenenfalls nur während der Phase der Reaktivierung auftreten, sichtbar machen.

Die Expressionsraten aus Tabelle 4 zeigen deutliche Unterschiede für die viralen miRNAs zwischen Fibroblasten und B-Zellen. Die geringe Anzahl der viralen miRNA Transkripte in Fibroblasten kann durch die zeitliche Limitation auf Grund der lytischen Replikation erklärt werden. Nach 48-72 Stunden führt die Infektion zum Cytopathischen Effekt (CPE) und zur Zelllyse. Die Wirkzeit von viralen miRNAs ist in diesem Kontext daher begrenzt. Dies könnte damit auch ausschlaggebend für die grundsätzlich MHV-68 zuzuordnenden miRNA Sequenzen nach der Hochdurchsatz-Sequenzierung sein (siehe Abbildung 15, Seite 57). In beiden Proben der B-Zellen (S11- und S11+) entsprachen konsistent ca. 10% der gesamten Sequenzen Teilen des MHV-68 Genoms, während nach der 48 stündigen Infektion der Fibroblasten lediglich 0,5% der erhaltenen Sequenzen MHV-68 zugeordnet werden konnten. Virale miRNAs, die spezifisch nur während der lytischen Replikation oder der Reaktivierung auftreten, konnten nicht identifiziert werden.

In den persistent infizierten B-Zellen kommt es nicht zur Zelllyse. Die RNA-Polymerase III abhängige, konstitutive Transkription kann so über die Zeit zu einer Akkumulation der viralen miRNAs und zu deutlich erhöhten *reads* bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung führen. Eine Zunahme der *reads* bei den TPA-induzierten B-Zellen kann zum einen auf eine Bedeutung während der Reaktivierung hindeuten, oder lediglich auf die zunehmende Anzahl viraler Genome bei der Replikation zurückzuführen sein. Das jedoch abweichende Verhalten von einzelnen miRNAs, wie z.B. mghv-mir-M1-9 und mghv-mir-M1-14, spricht gegen die zweite Hypothese. Eine Rolle der miRNAs während der Reaktivierung unterstützen auch die Beobachtungen in EBV. Während die drei BHRF1 miRNAs vor allem in der Latenzphase III [Xing and Kieff, 2007] und die 22 BART miRNAs in der Latenzphase II exprimiert werden [Cai et al., 2006, Grundhoff et al., 2006], verhält sich ihre Expression bei der lytischen Reaktivierung unterschiedlich. Initial sind BART und BHRF1 miRNAs während der Induktion der Reaktivierung exprimiert, und BHRF1-2 sowie BHRF1-3 erreichen die höchste Expression bereits nach 24 Stunden [Cai et al., 2006, Forte and Luftig, 2011]. BHRF1-1 hingegen scheint nicht induziert. Darüber hinaus weisen die BART miRNAs im Verlauf der Reaktivierung nur eine geringe Zunahme auf [Amoroso et al., 2011]. Das spezifische Verhalten einzelner miRNAs während der Induktion der Reaktivierung deutet damit auf eine biologische Funktion während dieser Phase des viralen Lebenszyklus hin.

Bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung entspricht die erhaltene *read*-Anzahl dem Vorkommen in der Population, nicht jedoch der Häufigkeit in einer einzelnen Zelle. Bei einer Gesamtzahl von z.B. 50 Millionen *reads* aus einer Bibliothek nach einer Hochdurchsatz-

Sequenzierung kann eine biologische Relevanz einer miRNA in einer Zelle gegebenenfalls erst ab ca. 50 *reads* gegeben sein [Cullen, 2011]. Die biologische Relevanz der mit einer niedrigen *read* Anzahl detektierten miRNA kann in beiden Zelllinien in Frage gestellt werden. Die in den Fibroblasten relativ geringen *read* Zahlen für die viralen miRNAs können durch die bereits oben angeführte zeitliche Limitation erklärt werden, und deuten auf eine geringe Rolle der viralen miRNAs während der lytischen Replikation hin. Dies zeigten auch Untersuchungen in KSHV. Die vollständige Deletion der miRNAs aus KSHV führte bei der lytischen Replikation zu keiner Beeinträchtigung für das Virus [Xu et al., 2006]. Aber auch die grundsätzliche Expression der miRNAs von KSHV ist durch die Replikation nicht gesteigert. Dies impliziert, dass die viralen miRNAs von KSHV ihre Hauptfunktion während der Latenz besitzen [Cai et al., 2006, Gottwein et al., 2006, Pfeffer et al., 2005, Samols et al., 2005].

Die miRNAs mghv-mir-M1-11 und mghv-mir-M1-15 konnten in der persistenten mit Wildtyp MHV-68 infizierten Zelllinie S11 nur in geringen *read* Zahlen detektiert werden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass diese viralen miRNAs nur zu bestimmten zellulären Zuständen exprimiert sein könnten. Dies würde auch die untypische Anordnung der miRNA mghv-mir-M1-11 auf dem Primärtranskript der vtRNA2 mit dem Muster vtRNA-miRNA-miRNA-miRNA erklären. Die Transkription durch RNA-Polymerase III stoppt gewöhnlich bei einem Oligo(dT)-Signal in der DNA, jedoch sind sogenannte Terminator *read-throughs* in Abhängigkeit von der Stärke der Terminatorsequenz (Anzahl der Nukleotide) sowie äußeren Einflüssen, wie z.B. dUTP/dCTP Menge und Ionenkonzentration, bekannt [Braglia et al., 2005]. Dies führt zur Annahme, dass einzelne virale miRNAs während der Latenz nur unter distinkten Bedingungen exprimiert sind.

Auf Grund der geringen *read* Zahlen für die miRNAs mghv-mir-M1-11 und mghv-mir-M1-15 wurden sie von weiteren Validierungen ausgeschlossen. Die Sensitivität der Methoden würde nicht ausreichen. Um die biologische Funktion der restlichen neuen miRNAs gleichzeitig mit der Validierung zu überprüfen, wurde ein *Northernblot* nach einer AGO2-IP durchgeführt. Die viralen miRNAs konnten dabei eindeutig in den RISC inkorporiert nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19, Seite 63). Lediglich für mghv-mir-M1-13 war trotz der höchsten *read*-Anzahl der neuen miRNAs (siehe Tabelle 4, Seite 59) ein Nachweis durch *Northernblot* nicht möglich. Dies kann durch den erhöhten G/C-Gehalt der miRNA begründet sein, da die verwendete Hybridisierungstemperatur für die anderen *Northernblot*-Sonden nicht spezifisch genug für diese miRNA war. Die Problematik der Detektion einzelner miRNAs auf Grund der Insensitivität der Validierungsmethode *Northernblot* wurde in einer Studie auch für die in dieser Arbeit gut nachweisbare miRNA mghv-mir-M1-1 diskutiert [Diebel et al., 2010]. Über eine bis zu 100-fach sensitivere *stem-*

loop RT-PCR [Chen et al., 2005, Diebel et al., 2010] konnte die miRNA mghv-mir-M1-13 in S11 und Wildtyp MHV-68 infizierten Ag8 Zellen letztlich aber nachgewiesen werden.

10.4 Homologien und konservierte Sequenzen von viralen miRNAs

Unter den Herpesviren KSHV und MHV-68 finden sich zahlreiche in ihrer Sequenz und gegebenenfalls Funktion konservierte Gene (vgl. siehe Abbildung 3, Seite 7). So zeigt MHV-68 mit der E3 Ubiquitin Ligase K3, der Proteinkinase ORF36 und den viralen Homologen der zellulären Proteine Cyclin D und Bcl-2 zum einen Homologie zum genetisch verwandten Herpesvirus KSHV, aber auch zu Proteinen der Wirtszelle [Loh et al., 2011, Sarid et al., 1997, Virgin et al., 1997]. Auf Grund der evolutiven Adaption der Viren an ihre Wirte, und die „feindliche“ Übernahme von zellulären Regulationswegen sind virale Homologe zu wichtigen zellulären Schaltproteinen bekannt [Alexander et al., 2000, Rezaee et al., 2006, Russo et al., 1996, Searles et al., 1999]. Was bei Proteinen auf Grund gewisser Einschränkungen durch Zusammenhänge zwischen Primär-, Sekundärstruktur und Funktion unweigerlich zu Homologie führt, gilt bei der Regulation durch miRNAs nicht mehr. Über die gesamte Sequenzlänge der 3'-UTR oder CDS eines Zielgens können die Bindestellen für eine oder mehrere miRNAs verteilt sein. Damit sind die gleichen Funktionen trotz heterogener miRNA-Sequenz möglich. Bei den zellulären miRNAs ist aber eine Besonderheit der hohe Grad an Konservierung zwischen den einzelnen Spezies. Bis zu 30% der über 1000 zellulären miRNAs besitzen die gleiche Sequenz in verschiedenen Organismen, und werden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch konservierte *targets* besitzen [Cai et al., 2006, Gottwein and Cullen, 2008, Lewis et al., 2005].

Wären die viralen miRNAs zu zellulären miRNAs ebenfalls homolog, würde das die Suche nach Zielgenen von viralen miRNAs deutlich vereinfachen. Doch selbst bei genetisch sehr verwandten Viren wie RRV (*Rhesus Monkey Rhadinovirus*) und KSHV, die sogar in der gleichen genomischen Region ihre miRNAs kodieren, finden sich untereinander keine Sequenzhomologien [Schäfer et al., 2007]. Darüber hinaus sind zwischen anderen Herpesviren die viralen miRNAs wenig konserviert und nur wenige Homologe sind bekannt (siehe Abbildung 17, Seite 60) [Cai et al., 2005; 2006, Rajewsky, 2006, Schäfer et al., 2007]. In dieser Arbeit wurden lediglich *seed*-Homologien von mghv-mir-M1-9 zu kshv-mir-K12-3 und mghv-mir-M1-14 zu mdv1-mir-M31 festgestellt, die restlichen miRNAs von MHV-68 sind virus-spezifisch. Der geringe Grad der Konservierung führt zu der Annahme, dass durch die miRNA-abhängige, sequenzspezifische Inhibition eines Zielgens im Verlauf der Evolution ein virus-spezifisches Interaktions- und Regulationsnetzwerk entstand [Skalsky

et al., 2007].

Einige zelluläre Regulationspunkte können jedoch für das Virus von so großer Bedeutung sein, dass es sich an die zelleigene Regulation des Wirtes anpasst. So weist KSHV mit der miRNA kshv-mir-K12-11 ein Ortholog zur zellulären miRNA mir-155 auf [Gottwein et al., 2007, Skalsky et al., 2007]. Darüber hinaus konnte ein funktionales Ortholog zu mir-155 auch in MDV (*Marek's disease virus*) nachgewiesen werden [Zhao et al., 2009]. EBV hingegen kodiert nicht für ein Ortholog dieser miRNA, sondern induziert die Expression der zellulären mir-155 [Cameron et al., 2008, Linnstaedt et al., 2010, Lu et al., 2008]. Dies deutet auf eine wichtige Funktion der zellulären miRNA bzw. deren Einfluss auf Zielgene für Gammaherpesviren. Ein Ortholog bedeutet, dass die beiden miRNAs vom 5'-Ende bis zum 3'-Ende der 22 nt langen maturen miRNA eine identische Sequenz besitzen. Bei geringerer Übereinstimmung wird die Anzahl der homologen Nukleotide angegeben (z.B. kshv-mir-K12-11 = 5'-8 nt Ortholog zu hsa-mir-155). Die miRNA mghv-mir-M1-4 wurde als ein 5'-9 nt Ortholog zur zellulären miRNA mmu-mir-151 beschrieben (vgl. Abbildung 17) [Gottwein and Cullen, 2008]. Jedoch kann bereits schon eine geringe *seed*-Sequenz Homologie innerhalb der sieben Nukleotide der Positionen 2-9 ausreichen, dass die identischen *targets* reguliert werden. Interessant sind hierbei die miRNAs ebv-mir-BART5, rLCV-mir-rL1-8 und mghv-mir-M1-7-5p, die perfekte *seed*-Homologie untereinander und zu den zellulären miRNAs mir-18a und mir-18b besitzen [He et al., 2005]. Diese beiden zellulären miRNAs werden aus dem *cluster* mir-17-92 gebildet und auf Grund des erhöhten Tumorwachstums bei B-Zelllymphomen in einem Mausmodell als potentielle humane Onkogene betrachtet [He et al., 2005].

Der geringe Grad der Konservierung und die nur teilweise bestehenden *seed*-Homologien der viralen miRNAs führen zu zwei Möglichkeiten. Erstens können die miRNA-Bindestellen für ein Zielgen auf der gesamten Sequenzlänge des Transkripts verteilt sein, und die miRNAs der verschiedenen Viren das gleiche Zielgen an verschiedenen Positionen binden [Umbach and Cullen, 2009]. Oder zweitens, kann die Regulation unterschiedlicher Schritte des z.B. gleichen metabolischen Reaktionsweges bei verschiedenen Viren zu einem gleichen Ergebnis führen [Cullen, 2009, Sood et al., 2006]. Während die Untersuchung der zweiten Möglichkeit nur mit Daten aus einer umfassenden Analyse eines Targetoms möglich wäre, konnte mit den ermittelten 14 sehr wahrscheinlichen Zielgenen dieser Arbeit (siehe Kapitel 8.5, Seite 96) die erste Möglichkeit untersucht werden. Die Sortierung der Zielgenkandidaten nach vorhergesagten Bindestellen für virale miRNAs durch TargetScan (siehe Anhang, Tabelle 15, Seite 126) ermöglichte die gezielte Betrachtung der potentiellen Zielgene einer speziellen viralen miRNA. Die Analyse der 3'-UTRs der Zielgene für z.B. mghv-mir-M1-9 mit sechs potentiellen Zielgenen erfolgte über das

miRvestigator Framework [Plaisier et al., 2011]. Dort können konservierte Sequenzmotive als mögliche miRNA-Bindestellen erkannt werden. Die Auswertung der 14 potentiellen Zielgene führte jedoch nur bei mghv-mir-M1-1 (n=3 Kandidaten) zu den viralen, funktionellen Homologen hsv2-mir-H2-1 und hsv1-mir-H6-3p. Für die anderen miRNAs von MHV-68 konnten anhand der ermittelten *targets* keine funktionellen Homologe aus anderen Viren bestimmt werden. Da hsv2-mir-H2-1 *antisense* zu dem viralen IE (*immediate early*) Genprodukt ICP0 liegt, findet hier eine Selbst-Regulation statt [Tang et al., 2009, Umbach and Cullen, 2009, Umbach et al., 2008]. Eine zelluläre Funktion konnte bislang aber noch nicht zugeordnet werden. Ein *target* der miRNA hsv-1-mir-H6-3p ist der virale Transkriptionsfaktor ICP4, welcher sich ebenfalls *antisense* zur miRNA befindet, und durch die Auto-Regulation die Latenzetablierung durch Unterdrückung des viralen Transkriptionsfaktors vorantreibt [Umbach and Cullen, 2009, Umbach et al., 2008]. In einer bioinformatischen Studie, die durch *cluster*-und GO-Analyse der vorhergesagten *targets* für miRNAs aus verschiedenen Viren funktionelle Homologe identifiziert hat, werden hsv-mir-H6-3p zusammen mit ebv-mir-BART17-5p und hcmv-mir-UL148D in eine funktionale Gruppe sortiert [Yu and He, 2011]. Ob mit diesen Ansätzen tatsächlich funktionelle Homologe identifiziert werden können, kann nur durch experimentelle Bestätigung der *targets* und umfassende Analysen der miRNA-Targetome der Viren geklärt werden.

10.5 Expression der zellulären miRNAs während der lytischen Replikation sowie während der Latenz und nach Induktion der Reaktivierung

Durch den Vergleich von nicht-infizierten und infizierten sowie nicht-induzierter und zur Reaktivierung induzierter Zellen war die Analyse des Expressionsmusters der zellulären miRNAs nach Infektion bzw. während der Reaktivierung möglich. Bei der Datenanalyse der Hochdurchsatz-Sequenzierung konnten jeweils über 2/3 der erhaltenen Sequenzen als miRNAs der Wirtszelle identifiziert werden (siehe Abbildung 15, Seite 57). Aus den miRNAs mit den größten Unterschieden während der lytischen Replikation fielen vor allem die miRNAs der Familie mir-16 (mmu-mir-15b und mmu-mir-16) durch eine Zunahme nach einer *de novo* Infektion mit Wildtyp MHV-68 auf. Einige Funktionen dieser miRNA-Familie sind bereits näher untersucht worden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Regulation von Bcl-2 (*B-cell Lymphoma 2*) durch mir-15/mir-16, welches eine zentrale Rolle in der Inhibition von Apoptose besitzt [Cimmino et al., 2005, Cory and Adams, 2002]. Die Induktion dieser zellulären miRNAs würde durch Aktivierung der intrinsischen Apoptose daher auf eine anti-virale Funktion hinweisen.

In der Entwicklung des lymphatischen Systems von Mäusen wurde mir-15/mir-16 als Regulator des Zellzyklus erwähnt [Costa et al., 2007]. Durch die Inhibition von wichtigen *checkpoint*-Genen, wie z.B. Cyclin D1 (CCND1) [Linsley et al., 2007], erfolgt der Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase [Liu et al., 2008]. Der Zellzyklusarrest scheint daher für lytisch replizierende Viren unter Umständen von Vorteil, da auf Grund der reduzierten zellulären DNA- und RNA-Synthese in G0/G1 ausreichend Ribonukleotide für die virale Replikation vorhanden sind [Chen and Makino, 2004]. Dabei ist auch die *capping*-Effizienz für virale Proteine gesteigert, da der Schwerpunkt auf der viralen Proteinsynthese liegt [Bonneau and Sonnenberg, 1987]. Darüber hinaus benötigt der Zusammenbau der Virionen intakte Zellkompartimente und Membranen des TGN sowie rER, was während der Mitose nicht gegeben ist [Lowe et al., 1998, Warren, 1993]. Weiter zeigten Untersuchungen, dass Zellen ausserhalb des aktiven Zellzyklus weniger durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden [Nishioka and Welsh, 1994], was gleichzeitig auch für die latente Phase von Bedeutung ist. Für latent mit MHV-68 infizierte B-Zellen aus der Milz wurde gezeigt, dass sich ca. 95% der B-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden [Flaño et al., 2002]. Die hohe Abundanz der zellulären miRNA mir-16 konnte in der vorliegenden Arbeit auch für die persistent mit MHV-68 infizierte B-Zelllinie S11 gezeigt werden. In einer Studie mit miRNA *knock-out* EBV für die BHRF1 miRNAs konnte unabhängig einer *target*-Identifizierung jedoch ein positiver Einfluss auf die Progression des Zellzyklus in LCLs (*lymphoblastoid cell lines*, B-Zelllinie) gezeigt werden [Seto et al., 2010]. Dies führt zu der Annahme, dass der gleiche zelluläre Regulator (mir-15/mir-16), wie auch verschiedene virale miRNAs während der lytischen Replikation und der Latenz unterschiedliche Aufgaben besitzen.

Interessant ist, dass mir-16 auch in Zusammenhang mit einem schnellen Abbau von inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , IL-6 und IL-8 steht [Jing et al., 2005]. In Epithelzellen, die mit *Listeria monocytogenes* (gram-positives Bakterium) infiziert wurden, zeigte sich eine Induktion der zellulären mir-16 und führte zur spezifischen Inhibition der inflammatorischen Mediatoren bzw. der Zytokine [Izar et al., 2012]. Aus Untersuchungen mit MHV-68 ist bekannt, dass IL-6 nach einer Infektion stark induziert wird und in Zusammenhang mit der Etablierung und Aufrechterhaltung der Persistenz steht [Sarawar et al., 1996]. Im Gegensatz dazu kodiert KSHV für ein virales Homolog zum zellulären IL-6 [Osborne et al., 1999]. Über die Aktivierung der JAK/STAT und MAP Kinase Signalwege führt IL-6 erst zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an einen Entzündungsherd, und anschließend zur Stimulation von Lymphozyten und Mononukleären Zellen [Jones, 2005]. IL-6 nimmt daher eine Schlüsselposition beim Übergang der angeborenen zur adaptiven Immunantwort ein. Für MHV-68 bedeutet die Aktivierung

von IL-6 nach der Infektion die Rekrutierung der Zellen, die das Virus gegebenenfalls benötigt, um latent zu werden [Sarawar et al., 1998]. Eine durch die Infektion gleichzeitig stattfindende Induktion eines mit der Zeit immer potenter werdenden Regulators für das Zytokin wie mir-16 könnte eine übermäßige inflammatorische Reaktion des Wirtes verhindern.

Die Induktion des lytischen Zyklus aus der persistenten Phase in den S11 Zellen durch TPA erlaubte auch die Analyse der Expressionsänderungen der zellulären miRNAs. Wie bereits erwähnt, besitzen KSHV und MDV ein Ortholog zur zellulären miRNA mir-155, während EBV die Expression dieser lediglich induziert [Cameron et al., 2008, Linnstaedt et al., 2010, Lu et al., 2008, Skalsky et al., 2007, Zhao et al., 2009]. MHV-68 kodiert kein Ortholog für mir-155, wies aber erhöhte Expressionswerte nach Induktion des lytischen Zyklus auf (siehe Abbildung 20, Seite 67). In einer anderen Studie konnte in der Promyelozyten Zelllinie HL-60 aber gezeigt werden, dass die zelluläre miRNA mir-155 durch TPA-induzierte Differenzierung um bis zu 15-fach hochreguliert war [Schmittgen et al., 2008]. Falls die Hochregulation bei MHV-68 unabhängig von der TPA-Behandlung spezifisch in Zusammenhang mit der Induktion des lytischen Zyklus stehen sollte, könnte die Expressionssteigerung eine Gemeinsamkeit bei Infektionen durch Gammaherpesviren sein. KSHV und MDV-1, die beide für das Ortholog kodieren, stehen in Zusammenhang mit erhöhter Tumorigenese [Gottwein et al., 2007], was jedoch nicht für MDV-2 gilt, welches kein Ortholog zu mir-155 kodiert. Darüber hinaus ist mir-155 als verantwortlich für die B-Zell Transformation nach Infektion durch KSHV beschrieben worden [Gottwein et al., 2007], und trägt zur Regulation der humoralen sowie angeborenen Immunantwort bei [Rodriguez et al., 2007]. Weitere beschriebene Funktionen der mir-155 sind Haematopoetische Differenzierung, Immunität, Inflammation, Tumorigenese und Apoptose [Faraoni et al., 2009].

11 Charakterisierung der eingesetzten Viren

11.1 Expression viraler miRNAs bei Infektionen durch MHV-68 Wildtyp und MHV-68 Δ 1-9 *in vitro*

Nach der Identifizierung und Validierung von miRNAs in MHV-68 war die Aufklärung der biologischen Funktion das nächste Ziel dieser Arbeit. Dazu sollte ein durch die BAC-Technologie hergestelltes rekombinantes MHV-68 eingesetzt werden, welchem die miRNAs entfernt wurden. Diese miRNA *knock-out* Mutante mit der Bezeichnung MHV-68 Δ 1-9 wurde bereits vor dieser Arbeit hergestellt. In der Annahme, dass lediglich neun virale

miRNAs in MHV-68 existieren [Pfeffer et al., 2005], wurden die miRNAs mghv-mir-M1-1 bis -7 *en bloc* und die miRNAs mghv-mir-M1-8 und -9 anhand subtiler Mutation deletiert (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.3, Abbildung 11, Seite 28). Erst durch Identifizierung der neuen miRNAs in dieser Arbeit stellte sich heraus, dass der Mutante Δ 1-9 darüber hinaus noch die miRNAs mghv-mir-M1-10 bis -12 fehlen.

Für die nachfolgenden Experimente zur Identifizierung von Zielgenen der viralen miRNAs wurde zunächst das Verhalten der Mutante Δ 1-9 in verschiedenen Zelllinien charakterisiert. Dies ermöglichte bereits erste Hinweise auf den Einfluss der viralen miRNAs auf eine *de novo* Infektion. Die Infektion sowie der Vergleich der lytischen Replikation der Viren MHV-68 Wildtyp und MHV-68 Δ 1-9 in Fibroblasten und alveolären Epithelzellen zeigte jedoch keine Unterschiede. Ebenfalls konnten keine messbaren Unterschiede in der Freisetzung der Virionen aus den infizierten Zellen festgestellt werden. Die Analyse des Zell-zu-Zell Transfers und einer damit möglicherweise veränderten Verbreitungseffizienz führte ebenfalls zu keinen feststellbaren Abweichungen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die viralen miRNAs während der lytischen Replikation nur eine untergeordnete Rolle spielen. Wie bereits oben eingeführt, ist die Phase der akuten lytischen Replikation durch Bildung des CPE und der einhergehenden Zelllyse zeitlich begrenzt. Die Bildung maturer miRNAs und die Übernahme biologischer Funktionen ist jedoch abhängig von der Transkriptionsleistung der Zelle, der Halbwertszeit der Zieltranskripte und der *target*-Proteine [Dölken et al., 2010]. Ausserdem ergaben die Daten aus der Hochdurchsatz-Sequenzierung in lytisch infizierten NIH3T3 nur ca. 0,5% Anteil viraler miRNA Sequenzen an der gesamten RNA Menge. In den persistent infizierten B-Zellen S11 hingegen betrug dieser Anteil ca. 10% (siehe Abbildung 15, Seite 57). Auch andere Studien kamen deshalb zu der Annahme, dass virale miRNAs in Herpesviren ihre primäre Funktion während der latenten Phase besitzen [Cai et al., 2006, Gottwein et al., 2006, Pfeffer et al., 2005, Samols et al., 2005].

Da das Ausbleiben eines beobachtbaren Phänotyps während der lytischen Replikation aber auch anhand einer fehlenden Expression der viralen miRNAs erklärt werden könnte, wurde eine Kinetik der miRNA Expression nach einer *de novo* Infektion durchgeführt. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen bemerkt, war der Nachweis viraler miRNAs von MHV-68 während der lytischen Replikation durch *Northernblot* schwer bis gar nicht möglich [Diebel et al., 2010]. Entsprechend den Autoren um Diebel et al. [2010] wurde auch in dieser Arbeit eine sensitivere *SYBR green* basierte *stem-loop* RT-PCR für den Nachweis etabliert. Eine RT-PCR ist schnell, spezifisch und benötigt wenig RNA als Ausgangsmaterial (vgl. 400 ng für RT-PCR; 50 μ g für *Northernblot*). Auf Grund der geringen Sequenzlänge der miRNAs muss die RT-PCR für jede einzelne miRNA validiert werden.

Durch den Nachweis in den persistent mit MHV-68 Wildtyp infizierten S11 Zellen und dem Vergleich zu Ag8 Zellen konnte der technische Hintergrund ermittelt werden. Die Ag8 Zellen wurden dabei mit Wildtyp oder der miRNA *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$ infiziert bzw. nicht infiziert. In $\Delta 1-9$ und nicht-infizierten Zellen können per Definition einzelne oder alle viralen miRNAs physisch nicht anwesend sein und dürften daher nicht detektiert werden. Die in diesen Proben erhaltenen Ct-Werte stellen den technischen Hintergrund für jede einzelne miRNA dar. Die Nachweisgrenze für einzelne Transkripte in der *stem-loop* RT-PCR gibt Schmittgen et al. [2008] mit Ct-Werten zwischen 32 - 35 an. Dies entspricht einem *cut-off* Wert von ca. $1^{-8} 2e(-\Delta Ct)$. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert, der reproduzierbar die Anwesenheit einer viralen miRNA aufzeigt, liegt im Durchschnitt bei $1^{-6} 2e(-\Delta Ct)$. Dies bedeutet, dass Ct-Werte über 30 bereits im methodischen Rauschen liegen und mit erhöhter Unsicherheit belegt sind. Die Detektionsschwierigkeiten für die miRNAs mghv-mir-M1-5 und mghv-mir-M1-6 konnten jedoch durch eine Erhöhung der Spezifität durch die Verwendung einer *taqman*-Sonde zumindest für mghv-mir-M1-5 beseitigt werden [Chen et al., 2005]. Zur weiteren Optimierung der RT-PCR für die miRNAs von MHV-68 könnten in Zukunft noch eine Effizienzermittlung und Optimierung der Primer sowie PCR-Bedingungen für jede einzelne miRNA durchgeführt werden [Chen et al., 2005, Meyer et al., 2010, Schmittgen et al., 2008].

Unabhängig davon konnten die meisten viralen miRNAs während der lytischen Replikation frühestens 8 bis 24 Stunden nach der Infektion detektiert werden. Die solide Detektion von mghv-mir-M1-1 nach 24 hpi konnte in NIH3T3 auch durch Diebel et al. [2010] gezeigt werden. Im gleichen Experiment konnten die Autoren aber mghv-mir-M1-5 bereits nach 6 hpi detektieren. Diese miRNA konnte in dieser Arbeit jedoch nur über die *taqman* RT-PCR verlässlich detektiert werden. Die Beschreibung der Primer-Dimer Bildung während der Reversen-Transkriptase Reaktion für diese virale miRNA deutet daher auf die Besonderheiten bei der Detektion einzelner miRNAs hin [Diebel et al., 2010]. Die höchste Expression der viralen miRNAs konnte in der vorliegenden Arbeit nach 48 Stunden gemessen werden, was auf Grund der eintretenden Zelllyse auch den Endpunkt des Zeitverlaufs darstellte. Die mit der Zeit zunehmende Expression der miRNAs deckte sich mit den Mikroarray-Ergebnissen für die Expression der vtRNAs während der lytischen Replikation [Ebrahimi et al., 2003, Martinez-Guzman et al., 2003] und den RLM-RT-PCR Daten für zwei miRNAs von MHV-68 durch Diebel et al. [2010].

12 Identifizierung von *target*-Sequenzen

12.1 Identifizierung viraler *target*-Sequenzen

Durch die Infektion von Zelllinien mit MHV-68 Δ 1-9 im Vergleich zu MHV-68 Wildtyp *in vitro* können Unterschiede in der Expression zellulärer Gene ermittelt werden. Die viralen miRNAs können aber auch die Regulation von viralen Transkripten beeinflussen [Gottwein and Cullen, 2008]. Nach dem gleichen experimentellen Prinzip wie zur Ermittlung zellulärer Zielgene können dadurch mögliche virale *targets* identifiziert werden. Bei der Infektion mit der miRNA *knock-out* Mutante sollten virale Zielgene nicht inhibiert werden und dadurch eine erhöhte Expression aufweisen. Die Analyse wurde für ausgewählte virale Gene mittels RT-PCR durchgeführt.

In HSV sind Gene bekannt, die *antisense* kodierende Sequenzen für virale miRNAs besitzen und auch experimentell nachweislich von diesen translational gehemmt werden [Tang et al., 2008; 2009, Umbach et al., 2008]. Dies legt nahe, dass für das MHV-68 Gen M2 die beiden *antisense* liegenden miRNAs mghv-mir-M1-13 und mghv-mir-M1-8 ebenso regulativ wirken könnten. Den miRNAs aus anderen Herpesviren, die nachweislich virale Gene als Zielstruktur besitzen, konnte bislang keine Regulation eines zellulären Transkripts nachgewiesen werden. Diese Möglichkeit ist aber nicht auszuschließen, da eine einzelne miRNA mehrere hundert mRNAs beeinflussen kann [Gottwein and Cullen, 2008, Grundhoff and Sullivan, 2011].

Für M2 von MHV-68 sowie für die anderen ausgewählten viralen Gene konnte in Fibroblasten und B-Zellen mittels RT-PCR jedoch keine gesteigerte Expression bei Infektion mit der miRNA *knock-out* Mutante Δ 1-9 beobachtet werden. Dies kann einerseits dadurch erklärt werden, dass die viralen miRNAs keine viralen Zielgene besitzen, oder dass andererseits der Einfluss der miRNAs während der 48 Stunden Infektionsdauer zu gering war. Für die Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 stünde die zweite Annahme in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen während der lytischen Replikation (siehe Diskussion, Kapitel 11.1). Darüber hinaus ist es denkbar, dass M2 trotz seiner *antisense* Position zu zwei viralen miRNAs, nicht durch diese reguliert wird. Diese Möglichkeit belegen Ergebnisse mit HSV-2, welches wie HSV-1 eine miRNA *antisense* zu ICP0 besitzt, dieses aber trotzdem nicht reguliert [Tang et al., 2008, Umbach et al., 2008].

12.2 Identifizierung zellulärer *target*-Sequenzen

12.2.1 Bioinformatik und Mikroarray

Die bioinformatische Identifizierung von Zielgenen tierischer zellulärer sowie viraler miRNAs ist im Vergleich zu Pflanzen ungleich schwieriger. In Pflanzen ist eine perfekte Komplementarität einer größeren miRNA *seed*-Region (10 nt) bereits fast sicheres Indiz für eine Regulation [Ghosh et al., 2007]. In Tieren gilt für Zielsequenzen eine höhere Strukturvarianz, ein kürzeres Sequenzstück als *seed*-Region und Bindung trotz lückenhafter Basen- oder Misspaarung [Ghosh et al., 2007]. Die Ansätze der computer-basierten Analyse unterscheiden sich daher in der Berücksichtigung der Konserviertheit und Zugänglichkeit der Zielsequenzen, der statistischen Gewichtung und der Vorhersage von einzelnen oder multiplen miRNA-Bindestellen [Enright et al., 2003, Kertesz et al., 2007, Rehmsmeier et al., 2004]. Die aktuellsten Algorithmen sind miRanda, PICTAR, TargetScan, PITA und RNA Hybrid [Enright et al., 2003, Kertesz et al., 2007, Krek et al., 2005, Lewis et al., 2003, Rehmsmeier et al., 2004]. In verschiedenen Studien konnten die Algorithmen untereinander maximal lediglich 10 - 20% Übereinstimmung erreichen [Bartel, 2009, Lieber and Haas, 2011, Rajewsky, 2006]. Die Auswahl für die Analysen innerhalb dieser Arbeit fiel auf TargetScan, da es die einfachste Umsetzung für eine unverzerrte Betrachtung des gesamten murinen Genoms ermöglichte. Die Ergebnislisten ergaben mehrere hundert potentielle Zielgene für eine virale miRNA. Eine Einzelanalyse dieser ist auf Grund der rein statistisch möglichen falsch-positiven und falsch-negativen Kandidaten nicht zielgerichtet [Bartel, 2004, Lieber and Haas, 2011, Pfeffer et al., 2005]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Analyse des miRNA Targetoms von EBV aus Lymphoblastoiden Zellen konnten von den darin experimentell ermittelten Zielgenen für die zelluläre miRNA mir-155 durch TargetScan 69% vorhergesagt werden [Skalsky et al., 2012].

Wegen der dennoch bestehenden Unsicherheiten [Rajewsky, 2006] sind experimentelle Mittel zur Eingrenzung der falsch-positiven und -negativen Gene notwendig [Lieber and Haas, 2011]. Auch trotz der diskutierten geringen Effekte oder mechanistischen Feinsteuerung der Genexpression durch miRNAs [Cullen, 2011, Gottwein and Cullen, 2008] wurden Mikroarrays als probates Mittel zur *target*-Identifizierung viraler und zellulärer miRNAs verwendet [Gottwein et al., 2007, Lim et al., 2005, Samols et al., 2007, Skalsky et al., 2007, Ziegelbauer et al., 2009]. Weitere experimentelle Ansätze sind darüber hinaus die Analysen des Proteoms [Grosshans and Filipowicz, 2008] und die gleichzeitige Extraktion von miRNAs und mRNAs durch Immunopräzipitationen [Beitzinger et al., 2007, Orom and Lund, 2007] mit anschließender Mikroarray-Analyse [Dölken et al., 2010].

Die Infektion von Zellen mit der miRNA *knock-out* Mutante $\Delta 1-9$ müsste im Vergleich

zur Infektion mit MHV-68 Wildtyp zu einer Hochregulation der möglichen Zielgene führen. Von den signifikant regulierten Genen ($p\text{-value} < 0,05$, gepaarter t-Test) aus den alveolären Epithelzellen MLE-12 und B-Zellen Ag8 war der größte Teil tatsächlich hochreguliert (siehe Tabelle 7, Seite 87). Wie bereits mehrfach erwähnt, wird den miRNAs eher funktionales *fine-tuning* zugeschrieben [Cullen, 2011, Gottwein and Cullen, 2008]. Deshalb wurden relativ niedrige *cut-off* Werte gewählt. Dadurch sollte die Anzahl der falsch-negativen Gene so gering wie möglich gehalten werden. Eine Reduktion auf wahrscheinliche Zielgene als Kandidaten erfolgte durch die Kombination mit weiteren experimentellen Ansätzen zur Identifizierung viraler miRNA Zielgene.

12.2.2 miRNA *target*-Identifizierung über experimentelle Ansätze mittels RIP-CHIP und *Nanostring* nach Argonaut-IP

Auf Grund der in der Literatur angeführten Limitationen einer alleinigen Verwendung von Mikroarray-Experimenten [Rajewsky, 2006, Seto et al., 2010] sollte durch Kombination mehrerer Ansätze zur Identifizierung viraler miRNA *targets* die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, tatsächliche Zielgene zu finden [Lieber and Haas, 2011]. Von den bereits angeführten experimentellen Methoden zur Identifizierung viraler miRNAs (siehe Diskussion, Kapitel 12.2.1) wurde RIP-CHIP unter Verwendung verschiedener Zelllinien gewählt [Dölken et al., 2010]. Der experimentelle Ablauf sah vor, dass jeweils die spezifische IP gegen die unspezifische IP ins Verhältnis gesetzt wird, und eine infizierte Probe gegen eine vergleichbare nicht-infizierte Probe normalisiert wird. Dadurch ist es möglich, die durch zelluläre miRNAs regulierten sowie die durch eine Infektion induzierten Gene zu identifizieren [Dölken et al., 2010].

Von der nach der IP gewonnenen RNA aus den verschiedenen Zelllinien (MLE-12, S11/Ag8; alle jeweils im Triplikat) konnte lediglich eine Probe aus der persistent infizierten B-Zelllinie S11 über einen Mikroarray erfolgreich analysiert werden. Die Ursache, warum alle anderen Proben nicht erfolgreich mittels Mikroarray analysiert werden konnten, konnte bisher nicht gefunden werden. Grundsätzlich wurden alle RNA-Proben vor der Übergabe an das Mikroarray-Labor intern auf Qualität und Anreicherungs-effizienz überprüft. Dabei entsprachen alle Proben den erforderlichen *cut-off* Werten [Dölken et al., 2010]. Da die Durchführung von Mikroarray-Analysen nach Herstellerangaben für den *GeneChip Mouse Gene 1.0 ST* (Affymetrix) RNA-Mengen ab 200 ng benötigt, manche IP-Reaktionen jedoch lediglich 100-150 ng RNA ergaben, wurden mehrere IP-Reaktionen aus der gleichen Zellsorte als Triplikat in einer Probe gepoolt. Die erreichten ca. 600 ng RNA führten jedoch ebenfalls zu keinem Ergebnis. Dies könnte auf eine starke Degradation der mRNA nach der IP hinweisen. Bei der Untersuchung der Anreicherungs-effizienz wur-

de eine zelluläre miRNA per *stem-loop* RT-PCR gemessen. Aber auf Grund der geringen Länge sind miRNAs im Vergleich zu mRNAs sehr stabil. Da die gleichen Protokolle jedoch zur Herstellung der RNA-Proben für die *Nanostring* Technologie verwendet wurden, ist die Möglichkeit der mRNA Degradation unwahrscheinlich. Daher sind technische Schwierigkeiten bei der enzymatischen Prozessierung zur Herstellung der Mikroarray-spezifischen cDNA die wahrscheinlichste Erklärung.

Die aus S11 durch RIP-CHIP erhaltenen mRNAs sind spezifisch zum Zeitpunkt der IP mit dem RISC assoziiert. Diese können ebenso Zielsequenzen von viralen wie von zellulären miRNAs sein, was auf Grund der fehlenden Kontrolle einer Probe aus nicht-infizierten Zellen nicht unterschieden werden konnte. Die Aussagekraft dieser Methode würde durch die Normalisierung zwar gestärkt, berücksichtigt aber folgende Situation nicht: Eine mRNA, welche in nicht-infizierten Zellen von keiner miRNA reguliert wird, befindet sich in der Kontrolle somit nicht mit dem RISC assoziiert und kann durch eine RISC-IP nicht detektiert werden. Wird nun durch die Infektion eine zelluläre miRNA induziert, die nachfolgend jenes Gen reguliert, wird dieses als mögliches *target* einer viralen miRNA misinterpretiert [Dölken et al., 2010, Lieber and Haas, 2011, Suffert et al., 2011]. Diese nicht auszuschließenden sekundären Effekte können durch weitere experimentelle Methoden, wie z.B. PAR-CLIP, analysiert werden [Gottwein et al., 2011]. Bei dieser Methode wird zwar die tatsächliche miRNA-Bindestelle ermittelt, kann aber auf Grund der UV-Stabilisierung von lediglich transienten miRNA:mRNA-Interaktionen auch biologisch unrelevante Zielgene aufzeigen. Wie bereits erwähnt, entgehen der RISC-IP Zielgene viraler miRNAs, die zum Zeitpunkt der IP nicht exprimiert sind. Dies gilt jedoch auch für RIP-*Nanostring* und PAR-CLIP.

Im Vergleich zu den anderen Methoden sieht die Prozessierung der RNA bei *Nanostring* nach der IP keine enzymatischen Zwischenschritte vor (siehe Material und Methoden, Kapitel 5.2.9, Seite 44). Möglicherweise war dies der Grund, weshalb im Gegensatz zu den Mikroarrays, mit *Nanostring*-Technologie die aus den AGO2-IP erhaltene RNA erfolgreich analysiert werden konnte. Ein Nachteil der *Nanostring*-Technologie gegenüber Mikroarrays war allerdings die Begrenzung auf eine ausgewählte Anzahl an möglichen Zielgenen, wohingegen mit Mikroarrays eine vollständige Analyse möglich gewesen wäre. Die 100 für die *Nanostring*-Analyse ausgewählten Gene ergaben sich aus den Topkandidaten der einzelnen Methoden, und Kombinationen aus diesen (siehe Abbildung 34, Seite 95). Bei einer näheren Betrachtung der Verteilung der Herkunft innerhalb der 14 letztlich ermittelten potentiellen Zielgenkandidaten (siehe Tabelle 11, Seite 96) ergab sich folgendes Bild: Aus den Kombinationen Bioinformatik und Mikroarray-Analyse stammten 7% aus MLE-12 und 21% aus Ag8. Aus der RIP-CHIP Analyse fanden sich nur 4%, was

einem Gen entspricht. Den größten Anteil an den 14 potentiellen Zielgenkandidaten trug aber die Kombination aller drei Ansätze (siehe Tabelle 12). Die 20 Treffer der Intersektion aus RIP-CHIP, TargetScan und Mikroarray-Analyse stellten sechs Gene, was damit einer Trefferwahrscheinlichkeit von 30% entspricht. Das deutet darauf hin, dass eine Methode alleine zu viele falsch-positive Gene Kandidaten ergibt, über eine Kombination mehrerer Methoden jedoch die Wahrscheinlichkeit einer validen Identifizierung steigt. Gerade deshalb ist auch die funktionelle Bestätigung mittels Luciferase-Assay notwendig. Die Reduktion von ursprünglich mehreren Tausend Kandidaten auf 14 sehr wahrscheinliche Gene ist dabei ein großer Vorteil. Die GO-Analyse der 14 potentiellen Zielgene zeigte ein heterogenes Bild und konnte lediglich für fünf Kandidaten *Ribonukleotid Bindung* als molekulare Funktion sowie für zwei Kandidaten *negative Regulation des Zellzyklus* als biologischen Prozess identifizieren. Diese Streuung könnte auch ein Hinweis auf die vielfältigen regulativen Funktionen der viralen miRNAs sein.

	MLE-12 (T/A)	Ag8 (T/A)	S11 (R)	Kombination (T/A/R)
Anzahl ausgewählter Gene aus den verschiedenen Methoden ^a	30	29	25	20
Anzahl davon in den 14 potentiellen Zielgenen	2	6	1	6
Trefferwahrscheinlichkeit der Methode in Prozent	7%	21%	4%	30%

Tabelle 12: Prozentuale Darstellung der Trefferwahrscheinlichkeit einer einzelnen Methode zur Identifizierung von Zielgenen viraler miRNAs. Die Aufschlüsselung der Verteilung der 14 potentiellen Zielgenkandidaten erfolgte entsprechend ihrer Herkunft aus den verschiedenen Methoden. a) Die Anzahl wurde durch das Festlegen verschiedener *cut-off* Werte bei den einzelnen Methoden erhalten (siehe Abbildung 34, Seite 95). Zeichenerklärung: T, TargetScan; A, Mikroarray; R; RIP-CHIP S11

In einer Studie, die mittels RIP-CHIP Zielgene herpesviraler miRNAs identifizierte, wurden für KSHV 114 und für EBV 44 *targets* beschrieben [Dölken et al., 2010]. Zu diesen konnte aus den 14 potentiellen Kandidaten dieser Arbeit sowie den 20 Kandidaten aus der Intersektion der drei Identifizierungsansätze keine Überlappung festgestellt werden. Lediglich bei dem Vergleich zu den Mikroarray-Daten aus Ag8 (n=484) konnten sieben Gene für KSHV und zwei für EBV, sowie zu dem RIP-CHIP Unikat (n=718) für KSHV fünf Gene und eines zu EBV als Schnittmenge identifiziert werden. Die mit KSHV oder EBV überlappenden Gene entsprachen nicht den in dieser Arbeit angelegten Kriterien. Sie wiesen bei der TargetScan Analyse entweder keine miRNA Bindestelle auf oder lagen unterhalb der angesetzten *cut-off* Werte für Mikroarray ($\geq 1,25x$) oder RIP-CHIP ($\geq 2x$). Dies könnte bedeuten, dass zwischen den Viren nur wenige zelluläre Gene als *tar-*

get konserviert sind. Ein Beleg dafür wäre auch die geringe Schnittmenge von drei Genen zwischen den 114 KSHV und 44 EBV Zielgenen [Dölken et al., 2010]. Im Vergleich zu einer anderen Studie, die ebenfalls über RIP-CHIP Analysen eine Liste mit 704 putativen direkten Zielgenen für miRNAs von KSHV veröffentlichte [Suffert et al., 2011], konnten zu den 14 in der vorliegenden Arbeit identifizierten Zielgenen zwei Gene als Schnittmenge identifiziert werden (*Rab8a* und *Pif1*). Die Intersektion der *targets* für miRNAs von KSHV mit 704 aus Suffert et al. [2011] und 114 aus Dölken et al. [2010] ergab interessanterweise aber auch nur ein Gen (*Znf184*) als Schnittmenge.

In weiteren Untersuchungen wurde das gesamte Targetom von KSHV und EBV mittels PAR-CLIP analysiert und mit den veröffentlichten Zielgenen der beiden humanen Gammaherpesviren verglichen [Gottwein et al., 2011, Skalsky et al., 2012]. Von den durch Dölken et al. [2010] ermittelten 44 Zielgenen für EBV miRNAs konnten Skalsky et al. [2012] nur 14 mit einer EBV miRNA Bindestelle in der 3'-UTR identifizieren. Auf Grund der verwendeten EBV-positiven Zelllinie (B95.8), bei der ein Teil des EBV Genoms deletiert ist, fehlten bei der PAR-CLIP Analyse jedoch mehr als die Hälfte der viralen miRNAs. Damit könnte die Differenz von 30 Genen gegebenenfalls durch die in B95.8 fehlenden EBV BART miRNAs erklärt werden. Durch GO-Analysen konnten die einzelnen Untersuchungen überrepräsentierte molekulare Funktionen und biologische Prozesse identifizieren [Dölken et al., 2010, Gottwein et al., 2011, Suffert et al., 2011]. In allen Studien wurde ein potentieller Einfluss der miRNAs auf Apoptose, Zellzyklus, Transkription und DNA-Reparatur gefunden. Bei der Untersuchung von EBV miRNA *knock-out* Mutanten konnte unabhängig von einzelnen *targets* der Einfluss auf Apoptose und Zellzyklus experimentell bestätigt werden [Seto et al., 2010]. Bei den in dieser Arbeit identifizierten molekularen Funktionen und biologischen Prozessen (siehe Kapitel 8.3, Seite 87, Tabellen 8 und 9) findet sich wie bei anderen Studien die *Regulation der Transkription* innerhalb der wichtigsten Aufgaben [Gottwein et al., 2011]. Auf Grund der begrenzten Anzahl konnten weitere überrepräsentierte Funktionen nicht ermittelt werden. Zusammengefasst könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die miRNAs der verschiedenen Viren zwar nicht die gleichen Zielgene adressieren, letztlich aber ähnliche Effekte bewirken. So kann z.B. der Einfluss innerhalb eines Signalweges an verschiedenen Stellen erfolgen, das Resultat wird eine vergleichbare Veränderung des Signals, z.B. zu Gunsten des viralen Lebenszyklus, bleiben.

Bei dem Vergleich der Studien ist darüber hinaus noch zu beachten, dass Gottwein et al. [2011] KSHV-infizierte PEL Zelllinien (*Primary Effusion Lymphoma*) verwendeten. Von diesen Zelllinien BC-1, BCBL-1 und BC-3 sind die beiden letzteren KSHV positiv, wohingegen BC-1 KSHV sowie EBV positiv ist, aber lediglich die EBV BART miRNAs

exprimiert [Gottwein et al., 2011]. Für die RIP-CHIP Analyse verwendeten Dölken et al. [2010] neben der PEL Zelllinie BCBL-1 auch die KSHV und EBV negative B-Zelllinie DG75, welche durch lentivirale Transduktion jedoch die intronischen miRNAs von KSHV exprimiert (DG75-K10/12). Suffert et al. [2011] hingegen benutzten zuerst eine stabil transduzierte HEK293 Zelllinie, die ebenfalls die intronischen miRNAs von KSHV unter einem Doxycyclin-induzierbaren CMV Promotor exprimierte, wechselten für physiologischere Betrachtungen dann aber zu DG75-K10/12. Die aufgezählten Zelllinien sind damit zwar alle KSHV positiv, können sich aber zum einen in verschiedenen viralen Zuständen befinden, oder stellen auf Grund der lentiviralen Transduktion in gegebenenfalls für das Virus nicht relevante Zelltypen kein physiologisches System dar. Die gemeinsame Eigenschaft dieser Zelllinien ist aber die permanente Expression und Präsenz der viralen miRNAs. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sollten die verschiedenen Abschnitte der viralen Infektion abdecken, und lediglich die Zelllinie S11 weist eine permanente Expression der miRNAs von MHV-68 auf. Die *de novo* Infektion von MLE-12 sowie Ag8 bedeutet für das Virus vergleichbare Startbedingungen wie bei einer *in vivo* Infektion. Die viralen miRNAs in diesen Zellen müssen innerhalb des experimentell festgesetzten Zeitrahmens erst gebildet werden. Damit gelten für das Virus im Vergleich zu den oben beschriebenen Zelllinien physiologischere Bedingungen während der lytischen Replikation. Die ausbleibende Überlappung der *targets* zwischen alveolären Epithelzellen (MLE-12) und B-Zellen (Ag8) könnte ferner darauf verweisen, dass virale miRNAs in Abhängigkeit des zellulären Kontext unterschiedliche Zielgene aufweisen.

13 Modellvorstellung zur Wirkungsweise der miRNAs von MHV-68

Aus der Gesamtheit der aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten und den Ergebnissen aus der Literatur kann ein Modell zur Wirkungsweise der viralen miRNAs von MHV-68 entwickelt werden.

Bei einer *in vivo* Infektion mit MHV-68 (intranasale Inokulation) findet vor allem in alveolären Epithelzellen die akute lytische Replikation statt. Durch die räumliche Nähe der vtRNAs und miRNAs von MHV-68 werden beide durch RNA-Polymerase III kotranslational exprimiert [Bogerd et al., 2010, Diebel et al., 2010] und die vtRNAs sind bereits sehr früh nach der Infektion während der lytischen Replikation nachweisbar [Ebrahimi et al., 2003, Martinez-Guzman et al., 2003]. Weiter wurden die vtRNAs auch als Nachweis für die Latenz beschrieben [Bowden et al., 1997]. Die viralen miRNAs sind in KSHV

während der lytischen und der latenten Phase ebenfalls nachweisbar und abundant exprimiert [Cai et al., 2005, Grundhoff et al., 2006, Pfeffer et al., 2005, Samols et al., 2005]. Die lytische Replikation führt in den durch MHV-68 infizierten Zellen 48 - 96 Stunden nach dem Zeitpunkt der Infektion zu CPE und Zelllyse bzw. Freisetzung der gebildeten neuen Virionen. Die Expression der viralen miRNAs konnte bereits ab 8 - 24 hpi während der akuten Phase gezeigt [Diebel et al., 2010] und mittels RT-PCR eine stete Zunahme detektiert werden (siehe Abbildung 25, Seite 78). In der Hochdurchsatz-Sequenzierung konnten in NIH3T3 während der lytischen Infektion nur 0,5% Anteil viraler miRNAs an der Gesamtmenge detektierter miRNA-Sequenzen gezeigt werden (siehe Abbildung 15, Seite 57). Da sich bei der Charakterisierung der Viren MHV-68 Wildtyp und MHV-68 $\Delta 1-9$ kein messbarer Einfluss der fehlenden miRNAs auf die lytische Replikation, den Virionengress und den Zell-zu-Zell Transfer zeigte (siehe Kapitel 7, Seite 69 ff.), ergibt sich folgende Vorstellung für den Einfluss der viralen miRNAs während der akuten lytischen Replikation (siehe Abbildung 37, links): Die Expression der vmiRNAs nimmt nach einer *de novo* Infektion zu. Sie haben jedoch innerhalb des Zeitrahmens der lytischen Replikation nur geringe regulative Einflüsse, da sich gegebenenfalls die zu einer Regulation notwendigen Mengen maturer miRNA nicht bilden können. Nach Zelllyse bzw. Freisetzung der Virionen aus den Zellen, in denen die lytische Replikation stattfand, kommt es zur Infektion von Zellen des Latenzreservoirs.

Bei der *de novo* Infektion von Zellen des Latenzreservoirs ist gleich den Epithelzellen von einer steten Zunahme der Expression der miRNAs von MHV-68 auszugehen. Der zelluläre Kontext führt zur Veränderung des viralen Lebenszyklus. Die Latenz etabliert sich, und kann in eine frühe und persistente Phase weiter unterteilt werden. Während der frühen Phase findet die Latenzexpansion statt [Barton et al., 2010]. Mit der Verweildauer bzw. Persistenz des Virus in den Zellen steigt durch die basale RNA-Polymerase III abhängige Expression der viralen miRNAs deren Menge. Dies zeigte sich auch in der Hochdurchsatz-Sequenzierung, durch die in der persistent infizierten B-Zelllinie S11 ca. 10% Anteil viraler miRNAs an der Gesamtmenge detektierter miRNA-Sequenzen gefunden wurden (siehe Abbildung 15, Seite 57). In der Literatur wird die Hauptfunktion herpesviraler miRNAs hauptsächlich während der Latenz vermutet [Cai et al., 2005, Cullen, 2011, Gottwein et al., 2006, Pfeffer et al., 2005, Samols et al., 2005]. Damit ergibt sich für die Wirkungsweise der miRNAs von MHV-68 innerhalb von Zellen des Latenzreservoirs folgende Vorstellung (siehe Abbildung 37, rechts): Durch die stete Expression und das Überleben der latent infizierten Zelle kommt es zur Akkumulation der miRNAs oder zu einem durch die Biogenese und Degradation bestimmten Gleichgewicht. Eine regulativ wirksame Menge maturer miRNAs ist anwesend.

Zu ihrer Funktion während der Latenz wären zwei Möglichkeiten denkbar. Einerseits könnten sie Gene inhibieren, die zu einer Aufrechterhaltung der Latenz benötigt werden und damit für eine Reaktivierung sorgen. Andererseits könnten sie Gene, die eine lytische Replikation induzieren, zur Aufrechterhaltung der Latenz inhibieren. Die letztere Möglichkeit wird in der Literatur zumindest für virale Proteine als wahrscheinlichere angesehen [Cullen, 2009, Grey et al., 2005]. Offensichtlich sind zur detaillierteren Aufklärung der einzelnen Funktionen der viralen miRNAs jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

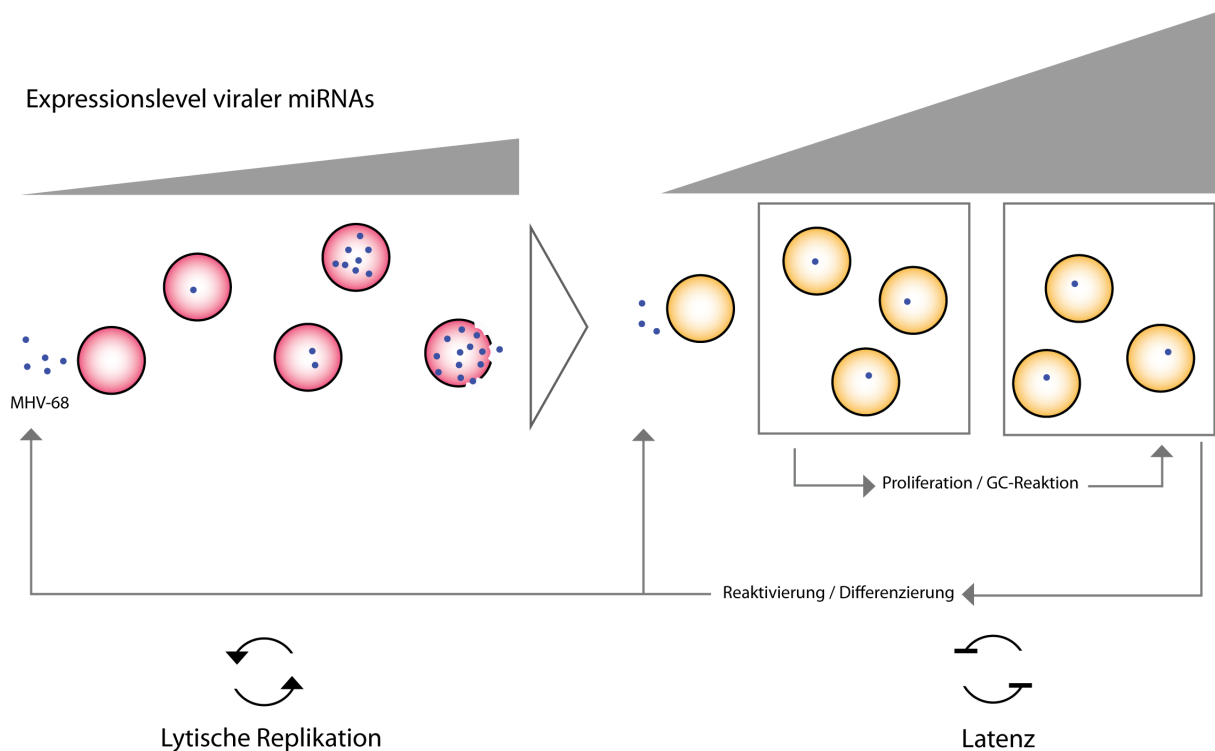


Abbildung 37: Modell der Funktionalität der viralen miRNAs bei einer Infektion durch MHV-68. Nach einer *de novo* Infektion mit MHV-68 erfolgt die lytische Replikation (Fibroblasten, Epithel- oder Endothelzellen) und führt durch die Lyse der Zelle zur Freisetzung von Virionen. Die Expression der viralen miRNAs beginnt bereits 8 hpi, endet aber zwangsläufig mit der Zellyse. Die Funktionalität innerhalb dieser Zeitspanne ist begrenzt. Die gebildeten Virionen infizieren Zellen des Latenzreservoirs (Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen). In der ersten Phase ist die Expression der vmiRNAs ähnlich der lytischen Replikation. Eine Regulationswirkung kann gegebenenfalls nur von den abundanten vmiRNAs erfolgen, oder es kommt unabhängig dieser zur Proliferation und Differenzierung. Im Laufe der Latenz kommt es zur Akkumulation der viralen miRNAs oder einem durch Bildung und Abbau bestimmten Gleichgewicht, und die Wahrscheinlichkeit einer funktionalen Regulation nimmt zu. Durch Zelldifferenzierung und Reaktivierung aus der Latenz kommt es zur erneuten Freisetzung von Virionen, die zu einer Re-Infektion führen.

14 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse des miRNA-Kodierungspotentials von MHV-68 sowie die Identifizierung potentieller Zielgene der MHV-68 miRNAs. Die erhaltenen Ergebnisse liefern wertvolle Hinweise für spätere *in vivo* Untersuchungen mit rekombinantem MHV-68.

Durch die Anwendung der 454-Sequenzierung konnten die neun vor dieser Arbeit bekannten miRNAs von MHV-68 bestätigt und sechs bislang unbekannte virale miRNAs identifiziert werden. Sie konnten distinkten Orten auf dem Genom von MHV-68 zugeordnet werden und fügten sich in das bereits bekannte Muster der Primärtranskripte vtRNA-miRNA-miRNA ein. Die sechs neuen miRNAs konnten durch *Northernblot* und RT-PCR validiert werden. Die von RNA-Polymerase III erzeugten und Drosha unabhängigen Transkripte konnten mittels *Northernblot* in einem physiologischen Hintergrund als Substrat für das zytoplasmatische RNase III Enzym Dicer gezeigt werden. Durch die Verwendung einer Argonaut-Immunopräzipitation konnten darüber hinaus die viralen miRNAs in Assoziation mit dem RISC nachgewiesen werden.

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erlaubte ferner die Analyse der zellulären miRNAs und führte zur Annotation von zahlreichen, bislang nicht nachgewiesenen zellulären miRNA*-Sequenzen. Der Vergleich von infizierten zu nicht-infizierten Zellen ermöglichte die Beschreibung der Expressionsänderung der zellulären miRNAs nach Infektion mit MHV-68. Dabei fiel vor allem die miRNA-Familie mir-15/16 auf, die in den unterschiedlichen Phasen des viralen Lebenszyklus induziert wird, jedoch scheinbar divergente Aufgaben für die Progression des viralen Lebenszyklus übernimmt. Für die zelluläre und B-Zell-spezifische miRNA mir-155 zeigte sich bei MHV-68 eine durch die Infektion und Reaktivierung bedingte Induktion der Expression ähnlich wie bei EBV.

Zur Untersuchung der regulatorischen Einflüsse der viralen miRNAs von MHV-68 wurde in dieser Arbeit das miRNA *knock-out* Virus $\Delta 1-9$ eingesetzt. Die Charakterisierung im Vergleich zu Wildtyp MHV-68 zeigte während der lytischen Phase keine nachweisbaren Unterschiede in Replikation, Virionenegress und Zell-zu-Zell Transfer. Dies legte nahe, dass die viralen miRNAs nur einen geringen Einfluss während der lytischen Phase besitzen. Die Expression der viralen miRNAs konnte in Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur jedoch bereits ab frühen Zeitpunkten während der lytischen Replikation nachgewiesen werden. Die dazu etablierte *stem-loop* RT-PCR für jede einzelne virale miRNA erlaubte eine schnelle und spezifische Analyse von sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial. Ebenfalls konnte ein Protokoll etabliert werden, dass den sensitiven Nachweis in *ex vivo* Proben ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Identifizierung von Zielgenen für die viralen miRNAs war die Kombination aus bioinformatischer Vorhersage durch Target-Scan, Mikroarray-Analyse der Genexpressionsänderung nach Infektion mit MHV-68 WT und MHV-68 Δ 1-9 sowie Argonaut-Immunopräzipitation mit anschließender Mikroarray-Analyse. Durch Anlegen verschiedener Auswahlkriterien konnten die in Frage kommenden Kandidaten eingegrenzt werden. Von diesen wurden 100 Gene ausgewählt und durch *Nanostring*-Analyse überprüft. Es ergaben sich dadurch 14 potentielle Zielgene für die miRNAs von MHV-68. Diese müssen nun in weiterführenden Experimenten mittels Luciferase-Assay auf ihre tatsächliche Regulation durch virale miRNAs validiert werden. Dazu wurde der Assay anhand einer aus der Literatur bekannten miRNA:mRNA-Interaktion (ebv-mir-BART-3:hsa-IPO7) etabliert. Mit den nun vorliegenden *target*-Kandidaten kann die Identifizierung von möglichen Phänotypen im *in vivo* System erleichtert werden.

Zusammenfassend ließ sich aus den hier erhaltenen Daten in Verbindung mit Ergebnissen aus anderen Veröffentlichungen ein Modell zur Wirkungsweise der miRNAs von MHV-68 erzeugen. Dieses legt in Übereinstimmung mit Thesen aus der Literatur nahe, dass die viralen miRNAs ihre Hauptfunktionen während der Latenz ausüben, z.B. bei der Regulation des Übergangs von der Latenz zur lytischen Replikation. Die Analyse und mechanistische Zuordnung der 14 Kandidaten in einen biologischen Kontext könnte zur Bestätigung dieser Annahme führen.

Teil V

Anhang

MLE-12 - 70 Kandidaten durch Kombination Mikroarray/Bioinformatik

Genname	Gensymbol	rel. Genexpression ($\Delta 1-9/WT$)
Myc target 1	Myct1	2,71
Early growth response 3	Egr3	2,66
Transmembrane protein EGF-like and two follistatin-like domains 2	Tmeff2	2,40
PBX3a; pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3	2,15
cAMP responsive element binding protein 3-like 2	Creb3l2	2,14
Serine hydrolase-like	Serhl	2,08
Collagen, type IV, alpha 4	col4a4	2,04
Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	Nmnat2	2,04
E2F transcription factor 2	E2f2	2,03
Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4	Gnb4	2,03
RNA binding motif protein 47	Rbm47	1,96
Forkhead box P1	Foxp1	1,95
Pleckstrin homology domain containing, family H member 2	Plekhh2	1,94
Single-stranded DNA binding protein 3	Ssbp3	1,92
PDZ and LIM domain 2	Pdlim2	1,92
Cathepsin C	Ctsc	1,92
Collagen, type VI, alpha 1	Col6a1	1,91
Furry homolog (Drosophila)	Fry	1,91
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	1,86
Metastasis suppressor 1	Mtss1	1,86
G protein-coupled receptor 85	Gpr85	1,86
DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	1,86
Mitochondrial tumor suppressor 1	Mtus1	1,85
Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	1,82
Sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence	Spred1	1,81
Pbx/knotted 1 homeobox	Pknox1	1,80
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	Camk2d	1,78
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	Ppp2r5e	1,76
CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	Cnot6l	1,74
Solute carrier family 44, member 1	Slc44a1	1,73
Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	1,72
Fortführung auf nächster Seite ...		

... Fortführung von letzter Seite		
Genname	Gensymbol	rel. Genexpression ($\Delta 1-9$ /WT)
ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1	Atp8a1	1,72
Src family associated phosphoprotein 2	Skap2	1,70
Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	Cdon	1,70
B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	1,70
Hmgcs1 protein; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Hmgcs1	1,68
Ubiquitin-conjugating enzyme UbcH2; ubiquitin-conjugating enzyme E2H	Ube2h	1,66
Vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C	Vapb	1,65
Ring finger protein 43	Rnf43	1,63
Integrator complex subunit 10; similar to integrator complex subunit 10	Ints10	1,63
Gephyrin	Gphn	1,62
Ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	Ash1l	1,61
SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog (S. cerevisiae)	Sys1	1,61
Cadherin 13	Cdh13	1,60
Calpain 6	Capn6	1,59
Hippocampus abundant transcript-like 1; S100 calcium binding protein A4	Hiatl1	1,59
Kruppel-like factor 3 (basic); similar to BKLF	Klf3	1,59
Catenin (cadherin associated protein), delta 1	Ctnnd1	1,58
Catenin beta interacting protein 1	Ctnnbip1	1,56
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	Smurf1	1,56
Cell cycle progression 1	Ccpg11	1,56
Kelch-like 24 (Drosophila)	Klhl24	1,56
ATPase family, AAA domain containing 1	Atad1	1,55
Transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	1,54
Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 8	Slc12a8	1,54
Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 7	Slc10a7	1,52
Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast); UBE2D3	Ube2d3	1,51
Pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2	Plekha2	1,49
Family with sequence similarity 129, member	Afam129a	1,49
SEC14-like 1 (S. cerevisiae)	Sec14l1	1,49
ER lipid raft associated 2	Erlin2	1,48
Trinucleotide repeat containing 6a	Tnrc6a	1,46
Fortführung auf nächster Seite ...		

... Fortführung von letzter Seite		
Genname	Gensymbol	rel. Genexpression ($\Delta 1-9$ /WT)
ATPase, class VI, type 11A	Atp11a	1,46
F-box and WD-40 domain protein 2	Fbxw2	1,46
Fem-1 homolog c (<i>C. elegans</i>)	Fem1c	1,45
SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	Setd7	1,45
Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Idh1	1,45
Syntaxin 12	Stx12	1,42
Myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Myl6	1,39

Tabelle 13: Die 70 Gene der Intersektion der Bioinformatischen Vorhersage und der Mikroarray-Analyse in MLE-12.

Ag8 - 46 Kandidaten durch Kombination Mikroarray/Bioinformatik

Genname	Gensymbol	rel. Genexpression ($\Delta 1-9$ /WT)
PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Pif1	1,77
Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	Ldlrap1	1,46
Cyclin F	Ccnf	1,44
Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	Frat2	1,44
Kinesin family member 20A	Kif20a	1,39
Midnolin	Midn	1,36
Lysophosphatidic acid receptor 1	Lpar1	1,36
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	Baz2a	1,36
Tet oncogene family member 3	Tet3	1,35
Activin receptor IIB	Acvr2b	1,35
NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 6	Nek6	1,34
GATA zinc finger domain containing 2B	Gatad2b	1,34
Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Nr2c2	1,34
Ubiquitin specific peptidase 7	Usp7	1,32
Mex3 homolog A (<i>C. elegans</i>)	Mex3a	1,32
SRY-box containing gene 4	Sox4	1,32
Hepatoma-derived growth factor	Hdgf	1,31
Early B-cell factor 3	Ebf3	1,31
Neurexin III	Nrxn3	1,31
Diencephalon/mesencephalon homeobox 1	Dmbx1	1,31
Calmodulin binding transcription activator 1	Camta1	1,30
Ankyrin repeat domain 52	Ankrd52	1,30
Hexamethylene bis-acetamide inducible 1	Hexim1	1,29
Fortführung auf nächster Seite ...		

... Fortführung von letzter Seite		
Genname	Gensymbol	rel. Genexpression ($\Delta 1-9/WT$)
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6	Mllt6	1,29
Transmembrane protein 64	Tmem64	1,28
Janus kinase 1	Jak1	1,28
Homeodomain interacting protein kinase 2	Hipk2	1,28
Kinase suppressor of ras 1	Ksr1	1,28
RAB2A, member RAS oncogene family	Rab2a	1,28
TEA domain family member 3	Tead3	1,28
SH3 and PX domains 2B	Sh3pxd2b	1,27
MYST histone acetyltransferase 2	Myst2	1,27
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	Arhgef5	1,27
Disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein	Dab2ip	1,27
Synaptotagmin VII	Syt7	1,27
Angiopoietin-like 2	Angptl2	1,26
Doublecortin-like kinase 1	Dclk1	1,26
Citron	Cit	1,26
Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Sos1	1,26
Solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	Slc5a3	1,26
Meis homeobox 1	Meis1	1,26
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	Camkk2	1,26
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	Entpd5	1,26
Nuclear factor I/B	Nfib	1,26
Family with sequence similarity 131, member B	Fam131b	1,25
CREB binding protein	Crebbp	1,25

Tabelle 14: Die 46 Gene der Intersektion der Bioinformatischen Vorhersage und der Mikroarray-Analyse in Ag8.

Ermittelte Zielgenkandidaten durch Kombination mehrerer Ansätze

Genname	Gensymbol	virale miRNA(s)	murine miRNAs
Mitochondrial tumor suppressor 1	Mtus1	M1-3	106/302; 135; 34a; 338 ; 19; 125; 200bc
Lysophosphatidic acid receptor 1	Lpar1	M1-9	23ab ; 200bc
Calmodulin binding transcription activator 1	Camta1	M1-9; M1-9	23ab; 17-5p; 129; 193ab; 30a; 34a ; 23ab
Hexamethylene bis-acetamide inducible 1	Hexim1	M1-1; M1-6	23ab; 181
Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	Nmnat2	M1-6	181 ; 132/212; 203
Torsin family 1, member B	Tor1b	M1-7-5p	19; 30a; 194 ; 17-5p; 19; 106
Forkhead box K1	Foxk1	M1-1; M1-9	203 ; 155; 200bc; 181; 23ab
Kinase suppressor of ras 1	Ksr1	M1-1	30a; 155 ; 15/16; 221/222; 9
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit E1	Atp6v1e1	M1-9	23ab
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	Dgat2	M1-13	124/506
RAB8A, member RAS oncogene family	Rab8a	M1-11-5p	30a; 204/211; 218 ; 9; 24
Neurexin III	Nrxn3	M1-9	23ab; 30a ; 137
Ribosomal protein S19 binding protein 1	Rps19bp1	M1-9	-
PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S, cerevisiae)	Pif1	M1-6	-

Tabelle 15: Die 14 potentiellen Zielgenkandidaten und deren vorhergesagte Bindesequenz für virale sowie murine miRNAs. In fetter Schrift hervorgehoben sind die 8mer-*sites* bindenden miRNAs, während 7mer-A1 und 7mer-m8 Bindestellen in normaler Schrift dargestellt sind.

Kurzbeschreibung der 14 ermittelten potentiellen Zielgenkandidaten

Mtus1	Tumorsuppressor; Bindung an Angiotensin II AT2 Rezeptor induziert Wachstumsinhibition [Seibold et al., 2003]
Lpar1	G-Protein gekoppelter Rezeptor; Lysophosphatische Säure (LPA) bindet EDG Rezeptor; Einfluss auf Proliferation, Migration, Blutplättchenaggregation, Chemotaxis, Tumorzellen Invasion [Choi et al., 2010, Hayashi et al., 2012]
Camta1	Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor; miRNA- <i>target</i> von mir-9/9*, mir-129§ und mir-17§ (§ durch TargetScan vorhergesagt, siehe Tabelle 15); Einfluss auf Hematopoetische Stammzell-Entwicklung; Induktion Zelldifferenzierung und Regulation des Zellzyklus [Liao et al., 2008, Nakatani et al., 2004]
Hexim1	RNA-Pol II Transkriptions-Inhibitor durch Interaktion mit dem RNA-Pol III erzeugten 7SKsnRNA; negative Regulation des Transkriptions-Elongationsfaktors P-TEFb; P-TEFb führt zur Wiederaufnahme bzw. Elongation von pausierten RNA-Pol II Transkriptionen [Peterlin et al., 2012]
Nmnat2	Katalysiert finalen Schritt in der NAD ⁺ Biosynthese; Überlebensfaktor für Axone [Mayer et al., 2010]
Tor1b	ggf. Molekulares Chaperon zur Faltung von Membranproteinen (durch Ähnlichkeit vorhergesagt); von GeneCard
Foxk1	Forkhead Transkriptionsfaktor; Regulation von myogenen Vorläuferzellen; von GeneCard

Ksr1	Gerüstprotein für Ras1; bei Deletion attenuierte Signalweiterleitung im Ras/Mapk-Signalweg; B-Zellen ohne Ksr1 zeigen reduzierte Proliferation und erhöhte Cytokin-abhängig-induzierte Apoptose (Myc); Zellzyklus Re-initiation nach DDR (DNA damage response); positiver Regulator des Raf/Mek/ERK-Signalweg [Gramling and Eischen, 2012, Razidlo et al., 2009]
Atp6v1e1	Ansäuerung von intrazellulären Organellen; notwendig für Proteinsortierung, Rezeptor-vermittelte Endozytose und Zymogen-Aktivierung; von GeneCard
Dgat2	Enzymatische Katalyse des letzten Schritts der Triacylglycerol Biosynthese (TG); TG ist Hauptspeicherform zellulärer Energie [McFie et al., 2011]
Rab8a	Benötigt für die <i>de novo</i> Lumenbildung durch Myo5b/Rab-Interaktionen; Rab GTPase Einfluss auf Membranverkehr [Roland et al., 2011]
Nrxn3	Reguliert im Nervensystem Zelladhäsion und Rezeptorbindungen; von GeneCard
Rps19bp1	Synonym: AROS (<i>active regulator of Sirtuin-1</i>); Sirt-1 besitzt Histondeacetylase Aktivität; inhibiert p53-vermittelte Transkriptionsaktivität [Kim et al., 2007]
Pif1	Helicase; Einfluss auf Wiederherstellung von Telomeren, DNA-Replikation, Genom Replikation und DDR (DNA damage response); Expression beim Übergang von G1/S-Phase; Casp-3 abhängige Inhibition von Apoptose; Einfluss auf S-Phasen-Eintritt und Zellzyklus-Progression [Dewar and Lydall, 2012, Gagou et al., 2011]

Teil VI

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht der humanpathogenen Herpesviren der Familie <i>Herpesviridae</i> nach Stockfleth [2005] mit den ihnen zugeordneten Krankheitsbildern	2
2	Aktuelle Anzahl der maturen miRNAs und ihrer Vorprodukte aus den Eintragungen von miRBase (Stand: Dezember 2010, <i>Release</i> 16), einer <i>online</i> Datenbank zur Übersicht aller miRNAs einer Spezies. Entnommen aus Lieber and Haas [2011]. *) Stand: September 2008, <i>Release</i> 12	22
3	Verteilung der Sequenzen innerhalb der sRNA-Bibliotheken der MHV-68 infizierten Zelllinien nach 454-Sequenzierung und Auswertung durch die Software von J. Zhu (2010). .	57
4	Die <i>read</i> -Anzahl der bekannten und neuen miRNA-Sequenzen. a) Schwarz markierte Bezeichnungen sind die von Pfeffer et al. [2005] identifizierten; in rot sind die noch nicht annotierten miRNA*-Sequenzen angegeben; in blau sind die neuen miRNA/miRNA*-Sequenzen von bislang unbekannten Vorläuferstrukturen hervorgehoben. b) Auf Grund der Charakteristika der 454-Sequenzierung muss die miRNA-Sequenz ggf. um ein zusätzliches „A“ ergänzt werden.	59
5	Zelluläre miRNAs von S11 (S11-) und S11, in denen der lytische Zyklus durch TPA-Induktion reaktiviert wurde (S11+) sowie von nicht-infizierten (NIH3T3-) und mit MHV-68 Wildtyp infizierten NIH3T3 (NIH3T3+).	65
6	Die 15 viralen miRNAs von MHV-68 mit ihrer <i>seed</i> -Sequenz und der Anzahl der durch TargetScan (v5.2) vorhergesagten konservierten <i>targets</i> sowie konservierten <i>sites</i> . 439 Gene sind dabei mögliche Ziele von mehr als einer viralen miRNA von MHV-68 (Dupletten).	85
7	Ergebnisse der Mikroarray-Analyse nach Infektion der Zelllinien MLE-12 und Ag8 mit Wildtyp MHV-68 und Δ 1-9.	87
8	GO-Analyse der molekularen Funktion und der biologischen Prozesse der 70 Treffer bei MLE-12. Gezeigt sind jeweils die Ränge 1 bis 5. Die molekularen Funktionen sind nach <i>p-value</i> sortiert, während die biologischen Prozesse nach der Häufigkeit geordnet sind. .	89
9	GO-Analyse der molekularen Funktion der 46 Treffer bei Ag8. Gezeigt sind die Ränge 1 bis 5. Die molekularen Funktionen sind nach <i>p-value</i> sortiert, während die biologischen Prozesse nach der Häufigkeit geordnet sind.	90

10	Die 20 <i>matches</i> der Kombination von bioinformatischer Vorhersage und <i>in vitro</i> Infektion von Ag8 mit Wildtyp und $\Delta 1-9$ (<i>cut-off</i> Wert $\geq 1,04x$) mit dem experimentellen Ansatz der AGO2-IP durch RIP-CHIP in S11 Zellen im Unikat. Die Zahl der Dubletten gibt die Anzahl vorhergesagter <i>target sites</i> für MHV-68 miRNAs in der 3'-UTR des Gens an. Der Quotient $\Delta 1-9/WT$ aus dem Ag8 Array zeigt die <i>cut-off</i> Werte für die einzelnen Gene.	93
11	Die 14 potentiellen Zielgenkandidaten, bestätigt durch die Kombination der vier Methoden, bioinformatische Vorhersage (T), Genexpressionsanalyse durch Mikroarray (A), RIP-CHIP (R) und <i>Nanostring</i> (N) zur Identifizierung von MHV-68 miRNA <i>targets</i> . *) Innerhalb der ersten 25 Ränge der 718 RIP-CHIP Kandidaten.	96
12	Prozentuale Darstellung der Trefferwahrscheinlichkeit einer einzelnen Methode zur Identifizierung von Zielgenen viraler miRNAs. Die Aufschlüsselung der Verteilung der 14 potentiellen Zielgenkandidaten erfolgte entsprechend ihrer Herkunft aus den verschiedenen Methoden. a) Die Anzahl wurde durch das Festlegen verschiedener <i>cut-off</i> Werte bei den einzelnen Methoden erhalten (siehe Abbildung 34, Seite 95). Zeichenerklärung: T, TargetScan; A, Mikroarray; R; RIP-CHIP S11	115
13	Die 70 Gene der Intersektion der Bioinformatischen Vorhersage und der Mikroarray-Analyse in MLE-12.	124
14	Die 46 Gene der Intersektion der Bioinformatischen Vorhersage und der Mikroarray-Analyse in Ag8.	125
15	Die 14 potentiellen Zielgenkandidaten und deren vorhergesagte Bindesequenz für virale sowie murine miRNAs. In fetter Schrift hervorgehoben sind die 8mer- <i>sites</i> bindenden miRNAs, während 7mer-A1 und 7mer-m8 Bindestellen in normaler Schrift dargestellt sind.	126

Teil VII

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ΔG	freie Energie Delta G
μF	Mikrofaraday
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
3D-ET	3D-Elektronentomographie
3'-UTR	3'-untranslated region
4SU	4-Thiouridin
AGO/AGO2	Argonaut
AGO-IP	Argonaut-Immunopräzipitation
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom
aSU	arbitrary square units
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
BoHV-1	Bovine herpesvirus 1
bp	base pair
BRCA1	Breastcancer 1
CCV	Chimpanzee Zytomegalievirus
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CPE	Cytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	dideoxy-nucleotides
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	deoxy nucleotides
dp	distaler Pol
dsDNA	double strand DNA
dsRBD	double strand RNA binding domain
E	early
EBERs	EBV-encoded RNAs
EBV	Epstein-Barr Virus
EtBr	Ethidiumbromid
Exp5	Exportin 5
FCS	fetal calf serum
fM	Femtomolar
gDNA	genomische DNA
gHV68	Gammaherpesvirus 68
GO	Gene Ontology
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HITS-CLIP	High-throughput sequencing of cross-linking immunoprecipitation
HIV	Humanes Immundefizienz Virus

hpi	hours post infection
hsa	homo sapiens
HSV	Herpes Simplex Virus
HV	Herpesvirus
HVT	Herpesvirus of Turkeys
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICTV	Internationales Komitee für Virus Taxonomie
IE	immediate early
IFN	Interferon
ILTV	Infectious Laryngotracheitis Virus
INM	inner nuclear membrane
kb	kilo base
kbp	kilo basepairs
KS	Kaposi's Sarkom
KSHV	Kaposi's Sarcoma-assoziiertes Herpesvirus
KV	Kilovolt
L	late
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LCV	Lymphocytic Chorimeningitis Virus
M	Molar
m7G	7-methylguanylate
MCD	Multizentrische Castleman's Krankheit
MCMV	Mouse Zytomegalievirus
MDV	Marek's Disease Virus
mghv	murine gammaherpesvirus
MHC-I/II	major histocompatibility complex
MHV-68	Murines Herpesvirus 68
miRISC	micro RNA loaded RISC
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
MLN	mediastinaler Lymphknoten
mM	Millimolar
mmu	mus musculus
MOI	Multiplizität der Infektion
MP	Makrophage
mRNA	messenger RNA
MuHV4	Murines Herpesvirus 4
NB	Northernblot
ncRNA	non coding RNA
ND10	Nukleäre Domäne 10
NGS	next generation sequencing
NK/T	natural killer t-cell
nm	Nanometer
NPC	Nasopharynx Karzinom
nt	Nukleotid
ONM	outer nuclear membrane
ORF	open reading frame
ori Lyt	origin of lytic Replication
PAGE	Polyacrylamidgel
PAR-CLIP	Photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEL	Primäres Effusions Lymphom
PFU	Plaqueforming units
±SD	± Standardabweichung
PML-NB	promyelocytic leukemia nuclear body

PNK	Polynukleotid Kinase
pp	proximaler Pol
PPi	organisches Phosphor
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
rHx	random Hexamer
RIP-CHIP	RISC Immunopräzipitation / Mikroarray-Analyse
RISC	RNA induced silencing complex
RLC	RISC-Lade-Komplex
RLCV	Rhesus Lymphocryptovirus
RLV	Rauscher Leukemia Virus
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RRV	Rhesus Macaque Rhadinovirus
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-Mix	Reverse Transkriptase Mix
RT-PCR	Realtime Polymerase-Kettenreaktion
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
siRNA	small inhibitory RNA
sRNA	small RNA
ssRNA	single strand RNA
SVV	Simian Varizellavirus
T/A/G/C	4 Basen der DNA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tm	Schmelzpunkt
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TPB	Tryptosephosphat broth
tRNA	transfer RNA
U	Unit
üN	über Nacht
UPL	Universal probe library
vtRNA	virale tRNA
VZV	Varizella-Zoster
WT	Wildtyp

Teil VIII

Literaturverzeichnis

Literatur

- H. Adler, M. Messerle, M. Wagner, and U. H. Koszinowski. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 74(15):6964–74, Aug 2000.
- S. M. Akula, P. P. Naranatt, N.-S. Walia, F.-Z. Wang, B. Fegley, and B. Chandran. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J Virol*, 77(14):7978–90, Jul 2003.
- L. Alexander, L. Denekamp, A. Knapp, M. R. Auerbach, B. Damania, and R. C. Desrosiers. The primary sequence of rhesus monkey rhadinovirus isolate 26-95: sequence similarities to kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus and rhesus monkey rhadinovirus isolate 17577. *J Virol*, 74(7):3388–98, Apr 2000.
- J. C. Alwine, W. L. Steinhardt, and C. W. Hill. Transcription of herpes simplex type 1 dna in nuclei isolated from infected hep-2 and kb cells. *Virology*, (60):302–307, 1974.
- J. A. Ambroziak, D. J. Blackbourn, B. G. Herndier, R. G. Glogau, J. H. Gullett, A. R. McDonald, E. T. Lennette, and J. A. Levy. Herpes-like sequences in hiv-infected and uninfected kaposi’s sarcoma patients. *Science*, 268(5210):582–3, Apr 1995.
- R. Amoroso, L. Fitzsimmons, W. A. Thomas, G. L. Kelly, M. Rowe, and A. I. Bell. Quantitative studies of epstein-barr virus-encoded micrnas provide novel insights into their regulation. *Journal of Virology*, 85(2):996–1010, Jan 2011.
- A. Angeloni, L. Heston, S. Uccini, M. C. Sirianni, F. Cottoni, M. V. Masala, D. Cerimele, S. F. Lin, R. Sun, M. Rigsby, A. Faggioni, and G. Miller. High prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in relatives of patients with classic kaposi’s sarcoma from sardinia. *J Infect Dis*, 177(6):1715–8, Jun 1998.
- D. Baek, J. Villén, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, and D. P. Bartel. The impact of micrnas on protein output. *Nature*, 455(7209):64–71, Sep 2008.
- J. Bartek, J. Bartkova, and J. Lukas. Dna damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56):7773–9, Dec 2007.
- D. P. Bartel. Micrnas: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97, Jan 2004.

- D. P. Bartel. Micrnas: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215–33, Jan 2009.
- E. Barton, P. Mandal, and S. H. Speck. Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: Lessons from the mouse. *Annual review of immunology*, Oct 2010.
- E. S. Barton, D. W. White, J. S. Cathelyn, K. A. Brett-McClellan, M. Engle, M. S. Diamond, V. L. Miller, and H. W. Virgin. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*, 447(7142):326–9, May 2007.
- F. Battke, S. Symons, and K. Nieselt. Mayday–integrative analytics for expression data. *BMC Bioinformatics*, 11:121, Jan 2010.
- I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde. mrna degradation by mirnas and gw182 requires both ccr4:not deadenylase and dcp1:dcp2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14):1885–98, Jul 2006.
- M. Beitzinger, L. Peters, J. Y. Zhu, E. Kremmer, and G. Meister. Identification of human microrna targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol*, 4(2):76–84, Jun 2007.
- D. J. Blackbourn and J. A. Levy. Human herpesvirus 8 in semen and prostate. *AIDS*, 11(2):249–50, Feb 1997.
- D. J. Blackbourn, E. T. Lennette, J. Ambroziak, D. V. Mourich, and J. A. Levy. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis*, 177(1):213–6, Jan 1998.
- D. J. Blackbourn, D. Osmond, J. A. Levy, and E. T. Lennette. Increased human herpesvirus 8 seroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. *J Infect Dis*, 179(1):237–9, Jan 1999.
- D. Blaskovic, M. Stanceková, J. Svobodová, and J. Mistríková. Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol*, 24(6):468, Dec 1980.
- P. E. Boehmer and A. V. Nimonkar. Herpes virus replication. *IUBMB Life*, 55(1):13–22, Jan 2003.
- H. P. Bogerd, H. W. Karnowski, X. Cai, J. Shin, M. Pohlers, and B. R. Cullen. A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral micrnas. *Molecular Cell*, 37(1):135–42, Jan 2010.
- A. M. Bonneau and N. Sonnenberg. Involvement of the 24-kda cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem*, 262:11134–39, 1987.

- F. P. Booy, B. L. Trus, A. J. Davison, and A. C. Steven. The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus. *Virology*, 215(2):134–41, Jan 1996.
- K. R. Bortoluci and R. Medzhitov. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of tlr and nlr. *Cell Mol Life Sci*, 67(10):1643–51, May 2010.
- I. W. Boss, K. B. Plaisance, and R. Renne. Role of virus-encoded micrnas in herpesvirus biology. *Trends in Microbiology*, 17(12):544–53, Dec 2009.
- V. Bouvard, R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. E. Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet, V. Coglian, and W. I. A. for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens—part b: biological agents. *Lancet Oncol*, 10(4):321–2, Apr 2009.
- R. J. Bowden, J. P. Simas, A. J. Davis, and S. Efstathiou. Murine gammaherpesvirus 68 encodes trna-like sequences which are expressed during latency. *J Gen Virol*, 78 (Pt 7):1675–87, Jul 1997.
- P. Braglia, R. Percudani, and G. Dieci. Sequence context effects on oligo(dt) termination signal recognition by *saccharomyces cerevisiae* rna polymerase iii. *J Biol Chem*, 280(20):19551–62, May 2005.
- X. Cai, S. Lu, Z. Zhang, C. M. Gonzalez, B. Damania, and B. R. Cullen. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral micrnas in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(15):5570–5, Apr 2005.
- X. Cai, A. Schäfer, S. Lu, J. P. Bilello, R. C. Desrosiers, R. Edwards, N. Raab-Traub, and B. R. Cullen. Epstein-barr virus micrnas are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, 2(3):e23, Mar 2006.
- K. Calame. Micrna-155 function in b cells. *Immunity*, 27(6):825–7, Dec 2007.
- J. E. Cameron, C. Fewell, Q. Yin, J. McBride, X. Wang, Z. Lin, and E. K. Flemington. Epstein-barr virus growth/latency iii program alters cellular micrna expression. *Virology*, 382(2): 257–66, Dec 2008.
- R. D. Cardin, J. W. Brooks, S. R. Sarawar, and P. C. Doherty. Progressive loss of cd8+ t cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of cd4+ t cells. *J Exp Med*, 184 (3):863–71, Sep 1996.
- R. W. Carthew and E. J. Sontheimer. Origins and mechanisms of mirnas and sirnas. *Cell*, 136 (4):642–55, Feb 2009.

- P. P. Chan and T. M. Lowe. Gtrnadb: a database of transfer rna genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue):D93–7, Jan 2009.
- Y. Chang, E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore. Identification of herpesvirus-like dna sequences in aids-associated kaposi’s sarcoma. *Science*, 266(5192):1865–9, Dec 1994.
- C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, and K. J. Guegler. Real-time quantification of micrnas by stem-loop rt-pcr. *Nucleic Acids Research*, 33(20):e179, Jan 2005.
- C.-J. Chen and S. Makino. Murine coronavirus replication induces cell cycle arrest in g0/g1 phase. *J Virol*, 78(11):5658–69, Jun 2004.
- E. H. Cheng, J. Nicholas, D. S. Bellows, G. S. Hayward, H. G. Guo, M. S. Reitz, and J. M. Hardwick. A bcl-2 homolog encoded by kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with bax or bak. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(2):690–4, Jan 1997.
- S. W. Chi, J. B. Zang, A. Mele, and R. B. Darnell. Argonaute hits-clip decodes microrna-mrna interaction maps. *Nature*, 460(7254):479–86, Jul 2009.
- Y.-L. Chiu and T. M. Rana. Rnai in human cells: basic structural and functional features of small interfering rna. *Molecular Cell*, 10(3):549–61, Sep 2002.
- J. W. Choi, D. R. Herr, K. Noguchi, Y. C. Yung, C.-W. Lee, T. Mutoh, M.-E. Lin, S. T. Teo, K. E. Park, A. N. Mosley, and J. Chun. Lpa receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50:157–86, Jan 2010.
- A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, and C. M. Croce. mir-15 and mir-16 induce apoptosis by targeting bcl2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(39):13944–9, Sep 2005.
- M. Cirone, C. Zompetta, A. Angeloni, D. V. Ablashi, S. Z. Salahuddin, A. Pavan, M. R. Torrisi, L. Frati, and A. Faggioni. Infection by human herpesvirus 6 (hhv-6) of human lymphoid t cells occurs through an endocytic pathway. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8(12):2031–7, Dec 1992.
- A. R. Cliffe, A. A. Nash, and B. M. Dutia. Selective uptake of small rna molecules in the virion of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol*, 83(5):2321–6, Mar 2009.

- C. B. Coleman, M. S. Nealy, and S. A. Tibbetts. Immature and transitional b cells are latency reservoirs for a gammaherpesvirus. *Journal of Virology*, 84(24):13045–52, Dec 2010.
- S. Cory and J. M. Adams. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2(9):647–56, Sep 2002.
- I. G. Costa, S. Roepcke, and A. Schliep. Gene expression trees in lymphoid development. *BMC Immunol*, 8:25, Jan 2007.
- B. Cullen. Viruses and micrnas. *Nature Genetics Supplement*, 30:6, May 2006.
- B. R. Cullen. Viral and cellular messenger rna targets of viral micrnas. *Nature*, 457(7228):421–5, Jan 2009.
- B. R. Cullen. Viruses and micrnas: Riscy interactions with serious consequences. *Genes & Development*, Sep 2011.
- D. Curanovic and L. Enquist. Directional transneuronal spread of alphaherpesvirus infection. *Future virology*, 4(6):591, Nov 2009.
- A. J. Davison, A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. Alcendor, D. J. McGeoch, and G. S. Hayward. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*, 84(Pt 1):17–28, Jan 2003.
- A. J. Davison, R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry. The order herpesvirales. *Arch Virol*, 154(1):171–7, Jan 2009.
- M. C. Derry, A. Yanagiya, Y. Martineau, and N. Sonenberg. Regulation of poly(a)-binding protein through pabp-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71:537–43, Jan 2006.
- J. M. Dewar and D. Lydall. Similarities and differences between uncappedtelomeres and dna double-strand breaks. *Chromosoma*, 121(2):117–30, Apr 2012.
- K. W. Diebel, A. L. Smith, and L. F. van Dyk. Mature and functional viral mirnas transcribed from novel rna polymerase iii promoters. *RNA (New York, NY)*, 16(1):170–85, Jan 2010.
- J. Ding, S. Huang, S. Wu, Y. Zhao, L. Liang, M. Yan, C. Ge, J. Yao, T. Chen, D. Wan, H. Wang, J. Gu, M. Yao, J. Li, H. Tu, and X. He. Gain of mir-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating rhogdia. *Nat Cell Biol*, 12(4):390–9, Apr 2010.

- J. G. Doench, C. P. Petersen, and P. A. Sharp. sirnas can function as mirnas. *Genes & Development*, 17(4):438–42, Feb 2003.
- P. C. Doherty, R. A. Tripp, A. M. Hamilton-Easton, R. D. Cardin, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. Tuning into immunological dissonance: an experimental model for infectious mononucleosis. *Curr Opin Immunol*, 9(4):477–83, Aug 1997.
- P. C. Doherty, J. P. Christensen, G. T. Belz, P. G. Stevenson, and M. Y. Sangster. Dissecting the host response to a gamma-herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 356(1408):581–93, Apr 2001.
- K. Döhner, A. Wolfstein, U. Prank, C. Echeverri, D. Dujardin, R. Vallee, and B. Sodeik. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*, 13(8):2795–809, Aug 2002.
- L. Dölken, G. Malterer, F. Erhard, S. Kothe, C. C. Friedel, G. Suffert, L. Marcinowski, N. Motsch, S. Barth, M. Beitzinger, D. Lieber, S. M. Bailer, R. Hoffmann, Z. Ruzsics, E. Kremmer, S. Pfeffer, R. Zimmer, U. H. Koszinowski, F. Grässer, G. Meister, and J. Haas. Systematic analysis of viral and cellular microrna targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by risc immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe*, 7(4):324–34, Apr 2010.
- B. Ebrahimi, B. M. Dutia, K. L. Roberts, J. J. Garcia-Ramirez, P. Dickinson, J. P. Stewart, P. Ghazal, D. J. Roy, and A. A. Nash. Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection. *J Gen Virol*, 84(Pt 1):99–109, Jan 2003.
- M. Ellis, Y. P. Chew, L. Fallis, S. Freddersdorf, C. Boshoff, R. A. Weiss, X. Lu, and S. Mitnacht. Degradation of p27(kip) cdk inhibitor triggered by kaposi’s sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J*, 18(3):644–53, Feb 1999.
- A. J. Enright, B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks. Microrna targets in drosophila. *Genome Biology*, 5(1):R1, Jan 2003.
- M. A. Epstein. Observations on the mode of release of herpes virus from infected hela cells. *J Cell Biol*, 12:589–597, 1962.
- M. A. Epstein, B. G. Achong, and Y. M. Barr. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitts lymphoma. *Lancet*, 1(7335):702–3, Mar 1964.
- A. Eulalio, J. Rehwinkel, M. Stricker, E. Huntzinger, S.-F. Yang, T. Doerks, S. Dorner, P. Bork, M. Boutros, and E. Izaurralde. Target-specific requirements for enhancers of decapping in mirna-mediated gene silencing. *Genes & Development*, 21(20):2558–70, Oct 2007.

- A. Eulalio, E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, and E. Izaurralde. Deadenylation is a widespread effect of mirna regulation. *RNA (New York, NY)*, 15(1):21–32, Jan 2009.
- B. Ewing and P. Green. Base-calling of automated sequencer traces using phred. ii. error probabilities. *Genome Res*, 8(3):186–94, Mar 1998.
- B. Ewing, L. Hillier, M. C. Wendl, and P. Green. Base-calling of automated sequencer traces using phred. i. accuracy assessment. *Genome Res*, 8(3):175–85, Mar 1998.
- I. Faraoni, F. Antonetti, J. Cardone, and E. Bonmassar. mir-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*, Mar 2009.
- K. K.-H. Farh, A. Grimson, C. Jan, B. P. Lewis, W. K. Johnston, L. P. Lim, C. B. Burge, and D. P. Bartel. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 310(5755):1817–21, Dec 2005.
- P. Feng, C. Liang, Y. C. Shin, E. Xiaofei, W. Zhang, R. Gravel, T. ting Wu, R. Sun, E. Usherwood, and J. U. Jung. A novel inhibitory mechanism of mitochondrion-dependent apoptosis by a herpesviral protein. *PLoS Pathog*, 3(12):e174, Dec 2007.
- A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–11, Feb 1998.
- E. D. Fixman, G. S. Hayward, and S. D. Hayward. Replication of epstein-barr virus orilyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on zta in cotransfection assays. *Journal of Virology*, 69(5):2998–3006, May 1995.
- E. Flaño, S. M. Husain, J. T. Sample, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated b cells, dendritic cells, and macrophages. *J Immunol*, 165(2):1074–81, Jul 2000.
- E. Flaño, I.-J. Kim, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. Gamma-herpesvirus latency is preferentially maintained in splenic germinal center and memory b cells. *J Exp Med*, 196(10):1363–72, Nov 2002.
- E. K. Flemington. Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *Journal of Virology*, 75(10):4475–81, May 2001.
- E. Forte and M. A. Luftig. The role of microRNAs in epstein-barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, Jul 2011.

- M. E. Gagou, A. Ganesh, R. Thompson, G. Phear, C. Sanders, and M. Meuth. Suppression of apoptosis by pif1 helicase in human tumor cells. *Cancer Res*, 71(14):4998–5008, Jul 2011.
- S. J. Gao, L. Kingsley, M. Li, W. Zheng, C. Parravicini, J. Ziegler, R. Newton, C. R. Rinaldo, A. Saah, J. Phair, R. Detels, Y. Chang, and P. S. Moore. Kshv antibodies among americans, italians and ugandans with and without kaposi’s sarcoma. *Nature Medicine*, 2(8):925–8, Aug 1996.
- Z. Gao, A. Krithivas, J. E. Finan, O. J. Semmes, S. Zhou, Y. Wang, and S. D. Hayward. The epstein-barr virus lytic transactivator zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *Journal of Virology*, 72(11):8559–67, Nov 1998.
- D. A. Garber, S. M. Beverley, and D. M. Coen. Demonstration of circularization of herpes simplex virus dna following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology*, 197(1): 459–62, Nov 1993.
- L. M. Gargano, J. M. Moser, and S. H. Speck. Role for myd88 signaling in murine gammaherpesvirus 68 latency. *Journal of Virology*, 82(8):3853–63, Apr 2008.
- G. K. Geiss, R. E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, N. Dowidar, D. L. Dunaway, H. P. Fell, S. Ferree, R. D. George, T. Grogan, J. J. James, M. Maysuria, J. D. Mitton, P. Oliveri, J. L. Osborn, T. Peng, A. L. Ratcliffe, P. J. Webster, E. H. Davidson, L. Hood, and K. Dimitrov. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*, 26(3):317–25, Mar 2008.
- Z. Ghosh, J. Chakrabarti, and B. Mallick. mirnomics-the bioinformatics of microrna genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(1):6–11, Nov 2007.
- W. Gibson. Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39(5-6):389–400, Jan 1996.
- L. Gillet, H. Adler, and P. G. Stevenson. Glycosaminoglycan interactions in murine gammaherpesvirus-68 infection. *PLoS ONE*, 2(4):e347, Jan 2007.
- E. Gottwein and B. R. Cullen. Viral and cellular micrnas as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe*, 3(6):375–87, Jun 2008.
- E. Gottwein, X. Cai, and B. R. Cullen. Expression and function of micrnas encoded by kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71:357–64, Jan 2006.
- E. Gottwein, N. Mukherjee, C. Sachse, C. Frenzel, W. H. Majoros, J.-T. A. Chi, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, U. Ohler, and B. R. Cullen. A viral microrna functions as an orthologue of cellular mir-155. *Nature*, 450(7172):1096–9, Dec 2007.

- E. Gottwein, D. L. Corcoran, N. Mukherjee, R. L. Skalsky, M. Hafner, J. D. Nusbaum, P. Sharmulailatpam, C. L. Love, S. S. Dave, T. Tuschl, U. Ohler, and B. R. Cullen. Viral microRNA targetome of kshv-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe*, 10(5): 515–26, Nov 2011.
- M. W. Gramling and C. M. Eischen. Suppression of ras/mapk pathway signaling inhibits myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, Feb 2012.
- K. S. Gray, J. C. Forrest, and S. H. Speck. The de novo methyltransferases dnmt3a and dnmt3b target the murine gammaherpesvirus immediate-early gene 50 promoter during establishment of latency. *Journal of Virology*, 84(10):4946–59, May 2010.
- W. L. Gray, B. Starnes, M. W. White, and R. Mahalingam. The dna sequence of the simian varicella virus genome. *Virology*, 284(1):123–30, May 2001.
- F. Grey, A. Antoniewicz, E. Allen, J. Saugstad, A. McShea, J. C. Carrington, and J. Nelson. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *Journal of Virology*, 79(18):12095–9, Sep 2005.
- S. Griffiths-Jones. The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue):D109–11, Jan 2004.
- S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright. mirbase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue):D140–4, Jan 2006.
- A. Grimson, K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, and D. P. Bartel. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*, 27(1):91–105, Jul 2007.
- H. Grosshans and W. Filipowicz. Proteomics joins the search for microRNA targets. *Cell*, 134(4): 560–2, Aug 2008.
- A. Grundhoff and C. S. Sullivan. Virus-encoded microRNAs. *Virology*, 411(2):325–43, Mar 2011.
- A. Grundhoff, C. S. Sullivan, and D. Ganem. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA*, 12(5): 733–50, May 2006.
- K. Grünewald, P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister, and A. C. Steven. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, 302(5649):1396–8, Nov 2003.

- S. Guggemoos, D. Hangel, S. Hamm, A. Heit, S. Bauer, and H. Adler. Tlr9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J Immunol*, 180(1):438–43, Jan 2008.
- M. Hafner, M. Landthaler, L. Burger, M. Khorshid, J. Hausser, P. Berninger, A. Rothballer, M. Ascano, A.-C. Jungkamp, M. Munschauer, A. Ulrich, G. S. Wardle, S. Dewell, M. Zavolan, and T. Tuschl. Transcriptome-wide identification of rna-binding protein and microRNA target sites by par-clip. *Cell*, 141(1):129–41, Apr 2010.
- J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang, and V. N. Kim. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the drosha-dgcr8 complex. *Cell*, 125(5):887–901, Jun 2006.
- A. Haque, N. Rachinel, M. R. Quddus, S. Haque, L. H. Kasper, and E. Usherwood. Co-infection of malaria and gamma-herpesvirus: exacerbated lung inflammation or cross-protection depends on the stage of viral infection. *Clin Exp Immunol*, 138(3):396–404, Dec 2004.
- D. Haussecker, Y. Huang, A. Lau, P. Parameswaran, A. Z. Fire, and M. A. Kay. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA (New York, NY)*, 16(4):673–95, Apr 2010.
- M. Hayashi, K. Okabe, K. Kato, M. Okumura, R. Fukui, N. Fukushima, and T. Tsujiuchi. Differential function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, 316(1):91–6, Mar 2012.
- L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, and S. M. Hammond. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043):828–33, Jun 2005.
- X. He and I. R. Lehman. An initial ATP-independent step in the unwinding of a herpes simplex virus type I origin of replication by a complex of the viral origin-binding protein and single-strand DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(6):3024–8, Mar 2001.
- W. Henle, V. Diehl, G. Kohn, H. Z. Hausen, and G. Henle. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science*, 157(3792):1064–5, Sep 1967.
- D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1):44–57, Jan 2009.
- E. Huntzinger and E. Izaurralde. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12(2):99–110, Feb 2011.
- G. Hutvagner and M. J. Simard. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):22–32, Jan 2008.

- G. Hutvágner and P. D. Zamore. A microrna in a multiple-turnover rna enzyme complex. *Science*, 297(5589):2056–60, Sep 2002.
- B. Izar, G. K. Mannala, M. A. Mraheil, T. Chakraborty, and T. Hain. microrna response to listeria monocytogenes infection in epithelial cells. *Int J Mol Sci*, 13(1):1173–85, Jan 2012.
- Q. Jing, S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. D. Padova, S.-C. Lin, H. Gram, and J. Han. Involvement of microrna in au-rich element-mediated mrna instability. *Cell*, 120(5):623–34, Mar 2005.
- D. C. Johnson and J. D. Baines. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol*, 9(5):382–94, May 2011.
- D. C. Johnson and M. T. Huber. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *Journal of Virology*, 76(1):1–8, Jan 2002.
- L. S. Johnson, E. K. Willert, and H. W. Virgin. Redefining the genetics of murine gammaherpesvirus 68 via transcriptome-based annotation. *Cell Host Microbe*, 7(6):516–26, Jun 2010.
- S. A. Jones. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for il-6. *J Immunol*, 175(6):3463–8, Sep 2005.
- D. H. Kedes, E. Operskalski, M. Busch, R. Kohn, J. Flood, and D. Ganem. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in ks risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Medicine*, 2(8):918–24, Aug 1996.
- J. D. Keene, J. M. Komisarow, and M. B. Friedersdorf. Rip-chip: the isolation and identification of mrnas, micrornas and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat Protoc*, 1(1):302–7, Jan 2006.
- M. Kertesz, N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, and E. Segal. The role of site accessibility in microrna target recognition. *Nature Genetics*, 39(10):1278–84, Oct 2007.
- E.-J. Kim, J.-H. Kho, M.-R. Kang, and S.-J. Um. Active regulator of sirt1 cooperates with sirt1 and facilitates suppression of p53 activity. *Molecular Cell*, 28(2):277–90, Oct 2007.
- V. N. Kim. Microrna biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5):376–85, May 2005.
- A. Krek, D. Grün, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky. Combinatorial microrna target predictions. *Nature Genetics*, 37(5):495–500, May 2005.

- J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11(9):597–610, Sep 2010.
- L. T. Krug, C. M. Collins, L. M. Gargano, and S. H. Speck. Nf-kappab p50 plays distinct roles in the establishment and control of murine gammaherpesvirus 68 latency. *J Virol*, 83(10):4732–48, May 2009.
- V. Lacoste, A. Lavergne, B. de Thoisy, J.-F. Pouliquen, and A. Gessain. Genetic diversity and molecular evolution of human and non-human primate gammaherpesvirinae. *Infect Genet Evol*, 10(1):1–13, Jan 2010.
- M. Lagunoff and P. A. Carroll. Inhibition of apoptosis by the gamma-herpesviruses. *Int Rev Immunol*, 22(5-6):373–99, Jan 2003.
- P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.-U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. D. Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. D. Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl. A mammalian microRNA expression atlas based on small rna library sequencing. *Cell*, 129(7):1401–14, Jun 2007.
- K. S. Lee, C. D. Cool, and L. F. van Dyk. Murine gammaherpesvirus 68 infection of gamma interferon-deficient mice on a balb/c background results in acute lethal pneumonia that is dependent on specific viral genes. *J Virol*, 83(21):11397–401, Nov 2009.
- E. T. Lennette, D. J. Blackbourn, and J. A. Levy. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in kaposi’s sarcoma patients. *Lancet*, 348(9031):858–61, Sep 1996.
- P. J. F. Leuschner, S. L. Ameres, S. Kueng, and J. Martinez. Cleavage of the sirna passenger strand during risc assembly in human cells. *EMBO Rep*, 7(3):314–20, Mar 2006.
- H. Leuzinger, U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *Journal of Virology*, 79(20):13047–59, Oct 2005.
- B. Lewis, C. Burge, and D. C. Bartel. Conserved seed pairing. *Cell*, (120):6, Jan 2005.
- B. P. Lewis, I. hung Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7):787–98, Dec 2003.

- Y. Li, E. Y. Chan, J. Li, C. Ni, X. Peng, E. Rosenzweig, T. M. Tumpey, and M. G. Katze. MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *J Virol*, 84(6): 3023–32, Mar 2010.
- R. Liao, J. Sun, L. Zhang, G. Lou, M. Chen, D. Zhou, Z. Chen, and S. Zhang. Micrnas play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem*, 104(3):805–17, Jun 2008.
- D. Lieber and J. Haas. Viruses and micrnas: a toolbox for systematic analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(6):787–801, Nov 2011.
- L. P. Lim, N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, and J. M. Johnson. Microarray analysis shows that some micrnas downregulate large numbers of target mrnas. *Nature*, 433(7027):769–73, Feb 2005.
- S. Linnstaedt, E. Gottwein, R. Skalsky, M. Luftig, and B. Cullen. Virally induced cellular mir-155 plays a key role in b-cell immortalization by ebv. *J Virol*, pages JVI.01248–10v1, Sep 2010.
- P. S. Linsley, J. Schelter, J. Burchard, M. Kibukawa, M. M. Martin, S. R. Bartz, J. M. Johnson, J. M. Cummins, C. K. Raymond, H. Dai, N. Chau, M. Cleary, A. L. Jackson, M. Carleton, and L. Lim. Transcripts targeted by the micrna-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 27(6):2240–52, Mar 2007.
- J. Liu, F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates, R. Parker, and G. J. Hannon. A role for the p-body component gw182 in micrna function. *Nat Cell Biol*, 7(12):1261–6, Dec 2005.
- Q. Liu, H. Fu, F. Sun, H. Zhang, Y. Tie, J. Zhu, R. Xing, Z. Sun, and X. Zheng. mir-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*, 36(16):5391–404, Sep 2008.
- J. Loh, G. Zhao, C. A. Nelson, P. Coder, L. Droit, S. A. Handley, L. S. Johnson, P. Vachharajani, H. Guzman, R. B. Tesh, D. Wang, D. H. Fremont, and H. W. Virgin. Identification and sequencing of a novel rodent gammaherpesvirus that establishes acute and latent infection in laboratory mice. *Journal of Virology*, 85(6):2642–56, Mar 2011.
- M. Lowe, N. Nakamura, and G. Warren. Golgi division and membrane traffic. *Trends in cell biology*, 8(1):40–4, Jan 1998.
- F. Lu, A. Weidmer, C.-G. Liu, S. Volinia, C. M. Croce, and P. M. Lieberman. Epstein-barr virus-induced mir-155 attenuates nf-kappab signaling and stabilizes latent virus persistence. *J Virol*, 82(21):10436–43, Nov 2008.

- I. J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson, and J. A. Doudna. In vitro reconstitution of the human risc-loading complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(2):512–7, Jan 2008.
- L. Mark, W. H. Lee, O. B. Spiller, B. O. Villoutreix, and A. M. Blom. The kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein (kcp) binds to heparin and cell surfaces via positively charged amino acids in ccp1-2. *Mol Immunol*, 43(10):1665–75, Apr 2006.
- D. Martinez-Guzman, T. Rickabaugh, T.-T. Wu, H. Brown, S. Cole, M. J. Song, L. Tong, and R. Sun. Transcription program of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol*, 77(19):10488–503, Oct 2003.
- C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, and P. D. Zamore. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of sirna into ago2-containing rna enzyme complexes. *Cell*, 123(4):607–20, Nov 2005.
- P. R. Mayer, N. Huang, C. M. Dewey, D. R. Dries, H. Zhang, and G. Yu. Expression, localization, and biochemical characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2. *J Biol Chem*, 285(51):40387–96, Dec 2010.
- P. J. McFie, S. L. Banman, S. Kary, and S. J. Stone. Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (dgat2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 286(32):28235–46, Aug 2011.
- D. J. McGeoch, D. Gatherer, and A. Dolan. On phylogenetic relationships among major lineages of the gammaherpesvirinae. *J Gen Virol*, 86(Pt 2):307–16, Feb 2005.
- D. J. McGeoch, F. J. Rixon, and A. J. Davison. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*, 117(1):90–104, Apr 2006.
- D. Medini, D. Serruto, J. Parkhill, D. A. Relman, C. Donati, R. Moxon, S. Falkow, and R. Rappuoli. Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol*, 6(6):419–30, Jun 2008.
- G. Meister, M. Landthaler, L. Peters, P. Y. Chen, H. Urlaub, R. Lührmann, and T. Tuschl. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, 15(23):2149–55, Dec 2005.
- T. C. Mettenleiter. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol*, (76):1537–1547, 2002.
- T. C. Mettenleiter. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol*, (113):163–169, 2006.
- T. C. Mettenleiter and T. Minson. Egress of alphaherpesviruses. *Journal of Virology*, 80(3):1610–1; author reply 1611–2, Feb 2006.

- T. C. Mettenleiter, B. G. Klupp, and H. Granzow. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol*, 9(4):423–9, Aug 2006.
- T. C. Mettenleiter, B. G. Klupp, and H. Granzow. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*, (143):222–234, 2009.
- M. L. Metzker. Emerging technologies in dna sequencing. *Genome Res*, 15(12):1767–76, Dec 2005.
- M. L. Metzker. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11(1):31–46, Jan 2010.
- S. U. Meyer, M. W. Pfaffl, and S. E. Ulbrich. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett*, Aug 2010.
- N. Miller and L. M. Hutt-Fletcher. Epstein-barr virus enters b cells and epithelial cells by different routes. *J Virol*, 66(6):3409–14, Jun 1992.
- K. Miyoshi, H. Tsukumo, T. Nagami, H. Siomi, and M. C. Siomi. Slicer function of drosophila argonautes and its involvement in risc formation. *Genes & Development*, 19(23):2837–48, Dec 2005.
- R. Morgan, A. Anderson, E. Bernberg, S. Kamboj, E. Huang, G. Lagasse, G. Isaacs, M. Parcells, B. C. Meyers, P. J. Green, and J. Burnside. Sequence conservation and differential expression of marek's disease virus micrnas. *J Virol*, 82(24):12213–20, Dec 2008.
- K. Nakatani, J. Nishioka, T. Itakura, Y. Nakanishi, J.-I. Horinouchi, Y. Abe, H. Wada, and T. Nobori. Cell cycle-dependent transcriptional regulation of calmodulin-binding transcription activator 1 in neuroblastoma cells. *Int J Oncol*, 24(6):1407–12, Jun 2004.
- A. A. Nash, B. M. Dutia, J. P. Stewart, and A. J. Davison. Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 356(1408):569–79, Apr 2001.
- A. V. Nicola, A. M. McEvoy, and S. E. Straus. Roles for endocytosis and low ph in herpes simplex virus entry into hela and chinese hamster ovary cells. *J Virol*, 77(9):5324–32, May 2003.
- W. K. Nishioka and R. M. Welsh. Susceptibility to cytotoxic t lymphocyte-induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target. *J Exp Med*, 179(2):769–74, Feb 1994.
- K. Okamura, J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory rnas in drosophila. *Cell*, 130(1):89–100, Jul 2007.

- S.-E. Ong and M. Mann. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (silac). *Nat Protoc*, 1(6):2650–60, Jan 2006.
- S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, silac, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 1(5):376–86, May 2002.
- U. Orom and A. Lund. Isolation of microrna targets using biotinylated synthetic micrnas. *Methods*, 43:4, Sep 2007.
- J. Osborne, P. S. Moore, and Y. Chang. Kshv-encoded viral il-6 activates multiple human il-6 signaling pathways. *Hum Immunol*, 60(10):921–7, Oct 1999.
- G. S. Pall, C. Codony-Servat, J. Byrne, L. Ritchie, and A. Hamilton. Carbodiimide-mediated cross-linking of rna to nylon membranes improves the detection of sirna, mirna and pirna by northern blot. *Nucleic Acids Research*, 35(8):e60, Jan 2007.
- J. Pauk, M. L. Huang, S. J. Brodie, A. Wald, D. M. Koelle, T. Schacker, C. Celum, S. Selke, and L. Corey. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*, 343(19):1369–77, Nov 2000.
- L. Peng, S. Ryazantsev, R. Sun, and Z. H. Zhou. Three-dimensional visualization of gammaherpesvirus life cycle in host cells by electron tomography. *Structure*, 18(1):47–58, Jan 2010.
- B. M. Peterlin, J. E. Brogie, and D. H. Price. 7sk snrna: a noncoding rna that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3(1):92–103, Jan 2012.
- S. Pfeffer, M. Zavolan, F. Grässer, M. Chien, J. Russo, J. Ju, B. John, A. Enright, D. Marks, C. Sander, and T. Tuschl. Identification of virus-encoded micrnas. *Science*, 304:3, Apr 2004.
- S. Pfeffer, A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. Grässer, L. van Dyk, C. Ho, S. Shuman, M. Chien, J. Russo, J. Ju, G. Randall, B. Lindenbach, C. Rice, V. Simon, D. Ho, M. Zavolan, and T. Tuschl. identification of micrnas of the herpesvirus familiy. *Nature Methods*, 2(4):8, Mar 2005.
- X. Piao, X. Zhang, L. Wu, and J. G. Belasco. Ccr4-not deadenylates mrna associated with rna-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol*, 30(6):1486–94, Mar 2010.
- C. L. Plaisier, J. C. Bare, and N. S. Baliga. mirvestigator: web application to identify mirnas responsible for co-regulated gene expression patterns discovered through transcriptome profiling. *Nucleic Acids Research*, May 2011.

- T. Ragoczy, L. Heston, and G. Miller. The epstein-barr virus rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in b lymphocytes. *Journal of Virology*, 72(10):7978–84, Oct 1998.
- N. Rajewsky. microrna target predictions in animals. *Nature Genetics*, 38 Suppl:S8–13, Jun 2006.
- T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, and X. Wang. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of sirna during risc activation. *Cell*, 123(4):621–9, Nov 2005.
- G. L. Razidlo, H. J. Johnson, S. M. Stoeger, K. H. Cowan, T. Bessho, and R. E. Lewis. Ksr1 is required for cell cycle reinitiation following dna damage. *J Biol Chem*, 284(11):6705–15, Mar 2009.
- T. A. Reese, J. Xia, L. S. Johnson, X. Zhou, W. Zhang, and H. W. Virgin. Identification of novel microrna-like molecules generated from herpesvirus and host trna transcripts. *Journal of Virology*, 84(19):10344–53, Oct 2010.
- M. Rehmsmeier, P. Steffen, M. Hochsmann, and R. Giegerich. Fast and effective prediction of microrna/target duplexes. *RNA (New York, NY)*, 10(10):1507–17, Oct 2004.
- J. Rehwinkel, I. Behm-Ansmant, D. Gatfield, and E. Izaurralde. A crucial role for gw182 and the dcp1:dcp2 decapping complex in mirna-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)*, 11(11):1640–7, Nov 2005.
- P. P. Reis, L. Waldron, R. S. Goswami, W. Xu, Y. Xuan, B. Perez-Ordenez, P. Gullane, J. Irish, I. Jurisica, and S. Kamel-Reid. mrna transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes. *BMC biotechnology*, 11(1):46, May 2011.
- S. A. R. Rezaee, C. Cunningham, A. J. Davison, and D. J. Blackbourn. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *J Gen Virol*, 87(Pt 7):1781–804, Jul 2006.
- L. Rodrigues, J. Filipe, M. P. Seldon, L. Fonseca, J. Anrather, M. P. Soares, and J. P. Simas. Termination of nf-kappab activity through a gammaherpesvirus protein that assembles an ec5s ubiquitin-ligase. *EMBO J*, 28(9):1283–95, May 2009.
- A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. van Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A. J. Enright, G. Dougan, M. Turner, and A. Bradley. Requirement of bic/microrna-155 for normal immune function. *Science*, 316(5824):608–11, Apr 2007.
- B. Roizman and D. Furlong. The replication of herpesviruses. *Comprehensive Virology*, ed. Fraenkel-Contrat H; NY(Plenum Press):229–403, 1974.

- B. Roizman and P. E. Pellet. The family herpesviridae: A brief introduction. *Fields Virology*, 5th edition, Vol. 2(Chapter 66):2479–2499, 2007.
- B. Roizman, L. Carmichael, F. Deinhardt, G. de The, A. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf. Herpesviridae. definition, provisional nomenclature, and taxonomy. *Intervirology*, 16(4):201–17, 1981.
- J. T. Roland, D. M. Bryant, A. Datta, A. Itzen, K. E. Mostov, and J. R. Goldenring. Rab gtpase-myo5b complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(7):2789–94, Feb 2011.
- M. D. Rosa, E. Gottlieb, M. R. Lerner, and J. A. Steitz. Striking similarities are exhibited by two small epstein-barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids vai and vaii. *Mol Cell Biol*, 1(9):785–96, Sep 1981.
- J. G. Ruby, C. H. Jan, and D. P. Bartel. Intronic microRNA precursors that bypass drosha processing. *Nature*, 448(7149):83–6, Jul 2007.
- J. J. Russo, R. A. Bohenzky, M. C. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, J. P. Parry, D. Peruzzi, I. S. Edelman, Y. Chang, and P. S. Moore. Nucleotide sequence of the kaposi sarcoma-associated herpesvirus (hhv8). *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(25):14862–7, Dec 1996.
- M. A. Samols, J. Hu, R. L. Skalsky, and R. Renne. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology*, 79(14):9301–5, Jul 2005.
- M. A. Samols, R. L. Skalsky, A. M. Maldonado, A. Riva, M. C. Lopez, H. V. Baker, and R. Renne. Identification of cellular genes targeted by kshv-encoded microRNAs. *PLoS Pathog*, 3(5):e65, May 2007.
- S. Sarawar, J. Brooks, R. Cardin, M. Mehrpooya, and P. Doherty. Pathogenesis of murine gammaherpesvirus-68 infection in interleukin-6-deficient mice. *Virology*, (249):8, Sep 1998.
- S. R. Sarawar, R. D. Cardin, J. W. Brooks, M. Mehrpooya, R. A. Tripp, and P. C. Doherty. Cytokine production in the immune response to murine gammaherpesvirus 68. *J Virol*, 70(5):3264–8, May 1996.
- R. Sarid, T. Sato, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, and Y. Chang. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nature Medicine*, 3(3):293–8, Mar 1997.
- A. Schäfer, X. Cai, J. P. Bilello, R. C. Desrosiers, and B. R. Cullen. Cloning and analysis of microRNAs encoded by the primate gamma-herpesvirus rhesus monkey rhadinovirus. *Virology*, 364(1):21–7, Jul 2007.

- T. D. Schmittgen, E. J. Lee, J. Jiang, A. Sarkar, L. Yang, T. S. Elton, and C. Chen. Real-time pcr quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44(1):31–8, Jan 2008.
- R. P. Searles, E. P. Bergquam, M. K. Axthelm, and S. W. Wong. Sequence and genomic analysis of a rhesus macaque rhadinovirus with similarity to kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virol*, 73(4):3040–53, Apr 1999.
- S. Seibold, C. Rudroff, M. Weber, J. Galle, C. Wanner, and M. Marx. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J*, 17(9):1180–2, Jun 2003.
- M. Selbach, B. Schwanhäusser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209):58–63, Sep 2008.
- E. Seto, A. Moosmann, S. Grömminger, N. Walz, A. Grundhoff, and W. Hammerschmidt. MicroRNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathog*, 6(8), Jan 2010.
- D. Shukla and P. G. Spear. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest*, 108(4):503–10, Aug 2001.
- J. P. Simas, R. J. Bowden, V. Paige, and S. Efstathiou. Four tRNA-like sequences and a serpin homologue encoded by murine gammaherpesvirus 68 are dispensable for lytic replication in vitro and latency in vivo. *J Gen Virol*, 79 (Pt 1):149–53, Jan 1998.
- H. Siomi and M. C. Siomi. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular Cell*, 38(3):323–32, May 2010.
- R. L. Skalsky, M. A. Samols, K. B. Plaisance, I. W. Boss, A. Riva, M. C. Lopez, H. V. Baker, and R. Renne. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of mir-155. *J Virol*, 81(23):12836–45, Dec 2007.
- R. L. Skalsky, D. L. Corcoran, E. Gottwein, C. L. Frank, D. Kang, M. Hafner, J. D. Nusbaum, R. Feederle, H.-J. Delecluse, M. A. Luftig, T. Tuschl, U. Ohler, and B. R. Cullen. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog*, 8(1):e1002484, Jan 2012.
- B. Sodeik, M. W. Ebersold, and A. Helenius. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, 136(5):1007–21, Mar 1997.
- P. Sood, A. Krek, M. Zavolan, G. Macino, and N. Rajewsky. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(8):2746–51, Feb 2006.
- B. Späth, G. Canino, and A. Marchfelder. tRNAse Z: the end is not in sight. *Cell Mol Life Sci*, 64(18):2404–12, Sep 2007.

- S. H. Speck and D. Ganem. Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell Host Microbe*, 8(1):100–15, Jul 2010.
- S. H. Speck, T. Chatila, and E. Flemington. Reactivation of epstein-barr virus: regulation and function of the bzlfl1 gene. *Trends in Microbiology*, 5(10):399–405, Oct 1997.
- O. B. Spiller, L. Mark, C. E. Blue, D. G. Proctor, J. A. Aitken, A. M. Blom, and D. J. Blackburn. Dissecting the regions of virion-associated kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus complement control protein required for complement regulation and cell binding. *J Virol*, 80(8):4068–78, Apr 2006.
- A. Stark, J. Brennecke, N. Bushati, R. B. Russell, and S. M. Cohen. Animal micrnas confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3’utr evolution. *Cell*, 123(6):1133–46, Dec 2005.
- B. Steer, B. Adler, S. Jonjic, J. P. Stewart, and H. Adler. A gammaherpesvirus complement regulatory protein promotes initiation of infection by activation of protein kinase akt/pkb. *PLoS ONE*, 5(7):e11672, Jan 2010.
- A. Stefan, M. D. Lillo, G. Frascaroli, P. Secchiero, F. Neipel, and G. C.-F. G. Development of recombinant diagnostic reagents based on pp85(u14) and p86(u11) proteins to detect the human immune response to human herpesvirus 7 infection. *J Clin Microbiol*, (37):3980–3985, 1999.
- P. G. Stevenson and S. Efstathiou. Immune mechanisms in murine gammaherpesvirus-68 infection. *Viral Immunol*, 18(3):445–56, Jan 2005.
- P. G. Stevenson, J. P. Simas, and S. Efstathiou. Immune control of mammalian gamma-herpesviruses: lessons from murid herpesvirus-4. *J Gen Virol*, 90(Pt 10):2317–30, Oct 2009.
- E. Stockfleth. Humane herpesviren. *Dermatologie und Venerologie*, II:55–73, 2005.
- G. Suffert, G. Malterer, J. Hausser, J. Viiliäinen, A. Fender, M. Contrant, T. Ivacevic, V. Benes, F. Gros, O. Voinnet, M. Zavolan, P. M. Ojala, J. G. Haas, and S. Pfeffer. Kaposi’s sarcoma herpesvirus micrnas target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLOS Pathogens*, 7(12):e1002405, Dec 2011.
- N. P. Sunil-Chandra, S. Efstathiou, J. Arno, and A. A. Nash. Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68. *J Gen Virol*, 73 (Pt 9):2347–56, Sep 1992.
- M. Szymański, V. A. Erdmann, and J. Barciszewski. Noncoding regulatory rnas database. *Nucleic Acids Research*, 31(1):429–31, Jan 2003.

- M. Takacs, F. Banati, A. Koroknai, J. Segesdi, D. Salamon, H. Wolf, H. H. Niller, and J. Minarovits. Epigenetic regulation of latent epstein-barr virus promoters. *Biochim Biophys Acta*, 1799(3-4):228–35, Jan 2010.
- F. Tang, P. Hajkova, D. O’Carroll, C. Lee, A. Tarakhovsky, K. Lao, and M. A. Surani. Micrnas are tightly associated with rna-induced gene silencing complexes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 372(1):24–9, Jul 2008.
- S. Tang, A. Patel, and P. R. Krause. Novel less-abundant viral micrnas encoded by herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating icp34.5 and icp0 mrnas. *J Virol*, 83(3):1433–42, Feb 2009.
- V. L. Tarakanova, V. Leung-Pineda, S. Hwang, C.-W. Yang, K. Matatall, M. Basson, R. Sun, H. Piwnica-Worms, B. P. Sleckman, and H. W. Virgin. Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a dna damage response by inducing phosphorylation of h2ax to foster viral replication. *Cell Host Microbe*, 1(4):275–86, Jun 2007.
- V. Tarasov, P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, and H. Hermeking. Differential regulation of micrnas by p53 revealed by massively parallel sequencing: mir-34a is a p53 target that induces apoptosis and g1-arrest. *Cell Cycle*, 6(13):1586–93, Jul 2007.
- N. Tavalai and T. Stamminger. Interplay between herpesvirus infection and host defense by pml nuclear bodies. *Viruses 2011, Vol. 3, Pages 336-346*, 1(3):1240–64, Dec 2009.
- G. S. Taylor and D. J. Blackbourn. Infectious agents in human cancers: lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses ebv and kshv. *Cancer Lett*, 305(2):263–78, Jun 2011.
- N. N. Thakur, S. El-Gogo, B. Steer, K. Freimüller, A. Waha, and H. Adler. A gammaherpesviral internal repeat contributes to latency amplification. *PLoS ONE*, 2(1):e733, Jan 2007.
- A. N. Theofilopoulos, R. Baccala, B. Beutler, and D. H. Kono. Type i interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology*, 23:307–36, Jan 2005.
- S. A. Tibbetts, L. F. van Dyk, S. H. Speck, and H. W. Virgin. Immune control of the number and reactivation phenotype of cells latently infected with a gammaherpesvirus. *J Virol*, 76(14):7125–32, Jul 2002.
- S. Till, E. Lejeune, R. Thermann, M. Bortfeld, M. Hothorn, D. Enderle, C. Heinrich, M. W. Hentze, and A. G. Ladurner. A conserved motif in argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the argonaute piwi domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10):897–903, Oct 2007.

- Y. Tomari and P. D. Zamore. Perspective: machines for rnai. *Genes & Development*, 19(5): 517–29, Mar 2005.
- B. Trus, W. Gibson, N. Cheng, and A. Steven. Capsid structure of simian cytomegalievirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegumen attachment sites. *J Virol*, 73:2181–2192, 1999.
- J. L. Umbach and B. R. Cullen. The role of rnai and micrnas in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Development*, 23(10):1151–64, May 2009.
- J. L. Umbach, M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen. Micrnas expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mrnas. *Nature*, 454(7205):780–3, Aug 2008.
- E. J. Usherwood, A. J. Ross, D. J. Allen, and A. A. Nash. Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for cd4 t cells. *J Gen Virol*, 77 (Pt 4):627–30, Apr 1996a.
- E. J. Usherwood, J. P. Stewart, K. Robertson, D. J. Allen, and A. A. Nash. Absence of splenic latency in murine gammaherpesvirus 68-infected b cell-deficient mice. *J Gen Virol*, 77 (Pt 11):2819–25, Nov 1996b.
- A. Vermeulen, L. Behlen, A. Reynolds, A. Wolfson, W. S. Marshall, J. Karpilow, and A. Khvorova. The contributions of dsrna structure to dicer specificity and efficiency. *RNA (New York, NY)*, 11(5):674–82, May 2005.
- H. W. Virgin and S. H. Speck. Unraveling immunity to gamma-herpesviruses: a new model for understanding the role of immunity in chronic virus infection. *Curr Opin Immunol*, 11(4): 371–9, Aug 1999.
- H. W. Virgin, P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. D. Canto, and S. H. Speck. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol*, 71 (8):5894–904, Aug 1997.
- A. Vogel, O. Schilling, B. Späth, and A. Marchfelder. The trnase z family of proteins: physiological functions, substrate specificity and structural properties. *Biol Chem*, 386(12):1253–64, Dec 2005.
- O. Voinnet. Origin, biogenesis, and activity of plant micrnas. *Cell*, 136(4):669–87, Feb 2009.
- E. K. Wagner. Individual hsv transcripts. *The Herpesviruses (ed. Roizman B)*, 3(Plenum Press (NY)):45–104, 1985.
- G. Warren. Membrane partitioning during cell division. *Annu Rev Biochem*, 62:323–48, Jan 1993.

- T. Watanabe, Y. Horikawa, K. Sato, and H. Saito. Methylcellulose media for plaque assay of murine leukemia virus. *J Clin Microbiol*, 16(3):542–4, Sep 1982.
- K. E. Weck, A. J. D. Canto, J. D. Gould, A. K. O’Guin, K. A. Roth, J. E. Saffitz, S. H. Speck, and H. W. Virgin. Murine gamma-herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon-gamma responsiveness: a new model for virus-induced vascular disease. *Nature Medicine*, 3(12):1346–53, Dec 1997.
- K. E. Weck, S. S. Kim, I. V. V. HW, and S. H. Speck. B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency. *J Virol*, 73(6):4651–61, Jun 1999.
- L. Weinmann, J. Höck, T. Ivancevic, T. Ohrt, J. Mütze, P. Schwille, E. Kremmer, V. Benes, H. Urlaub, and G. Meister. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mrnas. *Cell*, 136(3):496–507, Feb 2009.
- P. Wildy and D. Watson. Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27:25–47, 1962.
- A. Xie and R. Scully. Hijacking the dna damage response to enhance viral replication: gamma-herpesvirus 68 orf36 phosphorylates histone h2ax. *Molecular Cell*, 27(2):178–9, Jul 2007.
- L. Xing and E. Kieff. Epstein-barr virus bhrf1 micro- and stable rnas during latency iii and after induction of replication. *J Virol*, 81(18):9967–75, Sep 2007.
- Y. Xu, A. Rodriguez-Huete, and G. S. Pari. Evaluation of the lytic origins of replication of kaposi’s sarcoma-associated virus/human herpesvirus 8 in the context of the viral genome. *J Virol*, 80(19):9905–9, Oct 2006.
- S. Yekta, I.-H. Shih, and D. P. Bartel. MicroRNA-directed cleavage of hoXB8 mRNA. *Science*, 304(5670):594–6, Apr 2004.
- G. Yu and Q.-Y. He. Functional similarity analysis of human virus-encoded mirnas. *J Clin Bioinforma*, 1(1):15, Jan 2011.
- Y. Zhang and F. J. Verbeek. Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies. *J Integr Bioinform*, 7(3), Jan 2010.
- Y. Zhao, Y. Yao, H. Xu, L. Lambeth, L. P. Smith, L. Kgosana, X. Wang, and V. Nair. A functional microRNA-155 ortholog encoded by the oncogenic marek’s disease virus. *J Virol*, 83(1):489–92, Jan 2009.
- J. Y. Zhu, T. Pfuhl, N. Motsch, S. Barth, J. Nicholls, F. Grässer, and G. Meister. Identification of novel epstein-barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol*, 83(7):3333–41, Apr 2009.

-
- J. M. Ziegelbauer, C. S. Sullivan, and D. Ganem. Tandem array-based expression screens identify host mrna targets of virus-encoded micornas. *Nature Genetics*, 41(1):130–4, Jan 2009.
- M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3406–15, Jul 2003.

Teil IX

Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Prof. Dr. Heiko Adler für die Möglichkeit dieses spannenden, fordernde und interdisziplinäre Thema zu bearbeiten sowie für seine sehr gute Betreuung während der gesamten Dissertation recht herzlich bedanken. Seine stets freundliche und unkomplizierte Art, die auch bei fachlichen Diskussionen für die verständliche Darlegung komplexer Sachverhalte sorgte, hat mir sehr dabei geholfen, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Förstemann bedanken, der die Betreuung meiner Arbeit vor der Fakultät für Chemie, Biochemie und Pharmazie übernahm, und mir bei einigen Experimenten mit sehr gutem Rat sowie Gerät und Material zur Seite stand. Für die experimentelle Betreuung und Durchführung bedanke ich mich bei seiner Mitarbeiterin Dr. Alexandra Dittmer.

Ausserdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Gunter Meister, der mich im Rahmen des Verbundes „Micro-RNAs in Herpesvirus-Infektionen“ des Nationalen Genomforschungsnetzwerks (NGFN-plus) bei den Experimenten zur Identifizierung und Validierung der neuen miRNAs von MHV-68 nicht nur mit Sachmitteln, sondern auch mit vielen sehr guten Ideen stets unterstützte. Ebenfalls gilt mein Dank seiner Mitarbeiterin Dr. Jia Yun Zhu, die mir während den Experimenten und den Auswertungen immer zur Seite und für kompetente Diskussionen bereit stand.

Weiter gilt mein Dank Dr. Lars Dölken, der mir gleichfalls im Rahmen des NGFN bei der Etablierung und Durchführung der RIP-CHIP Methode stets behilflich war und immer ein riesiges Repertoire an sehr guten und nützlichen Tips teilte. Gleichzeitig bedanke ich mich auch bei seinen Mitarbeitern Lisa Marcinowski und Bernd Rädle, die immer einen Platz für mich in ihrem Labor hatten.

Ferner möchte ich mich beim Leiter des Verbundes des NGFN bedanken, Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas sowie den weiteren Mitgliedern, vor allem jedoch Prof. Dr. Friedrich Grässer, der mich mit Material und durch fachliche Diskussion bei verschiedenen Experimenten unterstützte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Vigo Heissmeyer und seinen Mitarbeitern Dr. Kai Höfig und Gitta Heinz. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Helmholtz Zentrum München, die mich während dieser Arbeit unterstützten. Besonders erwähnen möchte ich dabei Sebastian Grömminger, der mir bei der Etablierung der *stem-loop* RT-PCR sehr half.

Zusätzlich danke ich Olivia Prazeres da Costa für die Auswertung der Mikroarray-Daten und Übernahme der organisatorischen Angelegenheiten im Umgang mit Anbieterfirmen. Ebenfalls bedanke ich mich bei Silvia Weidner für die unermüdliche Bearbeitung der Proben.

Besonders bedanken möchte ich mich abschließend bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Adler. Dr. Christine Sattler, Dr. Shinji Ohno und Beatrix Steer standen mir jederzeit zur Seite und halfen mir stets bei allem, und mit allem aus. Das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima trug ebenfalls maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei.